

# Etablierung und Charakterisierung der Antigen-induzierten Arthritis in Interleukin-4-defizienten Mäusen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Thorsten Ulrich Michel**  
geboren am 10. Februar 1976 in Eberbach/Neckar

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. Bräuer,  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Pathologisches Institut

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. G. Hein  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Klinik für Innere Medizin III

Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Kriegsmann  
Pathologische Praxis  
Trier

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.12.2008

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Adjuvans-Arthritis
ACR	American College of Rheumatology
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl.: <u>a</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ell)
BiP	Schwere Kette bindendes Protein (engl.: heavy chain <u>b</u> inding <u>p</u> rotein)
BSA	bovines Serumalbumin
CAIA	Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (engl.: <u>c</u> ollagen- <u>a</u> ntibody- <u>i</u> nduced <u>a</u> rthritis)
CCP	zitruiniertes zyklisches Peptid (engl.: <u>c</u> itrullinated <u>c</u> yclic <u>p</u> eptide)
CD	cluster of differentiation / Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans (engl.: <u>c</u> omplete <u>F</u> reund's <u>a</u> djuvant)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (engl.: <u>c</u> ollagen- <u>i</u> nduced <u>a</u> rthritis)
ConA	Concanavalin A
CTL	Zytotoxische T-Zellen (engl.: <u>c</u> ytotoxic <u>T</u> lymphocytes)
DMARDs	Krankheit modulierende antirheumatische Medikamente (engl.: <u>d</u> isease- <u>m</u> odifying <u>a</u> nti <u>r</u> heumatic <u>d</u> rugs)
DTH	verzögerte Überempfindlichkeit (engl.: <u>d</u> elayed-type <u>h</u> ypersensitivity)
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fc	fragment cristallizable
FCS	Fetales Kälberserum (engl.: <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
GPI	Glukose-6-Phosphat-Isomerase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl.: <u>g</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor)
HE	Hämatoxylin/Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HSV-tk	Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus

IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KO	Knockout
LAG	Lymphozyten Aktivierungs-Gen (lymphocyte <u>a</u> ctivation <u>g</u> ene)
LK	Lymphknoten
mAk	monoklonaler Antikörper
mBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger ribonucleic acid
NOD	Non obese diabetes
NSAIDs	Nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente (engl.: <u>n</u> on <u>s</u> teroidal <u>a</u> nti <u>i</u> nflammatory <u>d</u> rugs)
OPG	Osteoprotegerin
OSM	Oncostatin M
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PE	R-Phycoerythrin
PGIA	Proteoglykan-induzierte Arthritis
PPD	Gereinigtes Proteinderivat (engl.: <u>p</u> urified <u>p</u> rotein <u>d</u> erivate)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	<u>R</u> eceptor <u>a</u> ctivator of <u>n</u> uclear factor <u><math>\kappa</math></u> B <u>l</u> igand
RF	Rheumafaktor
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt (engl.: <u>s</u> evere <u>c</u> ombined <u>i</u> mmunodeficiency)
SCWIA	Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis
SF	Synovialflüssigkeit
SFB	synovialer Fibroblast

STAT	Signalüberträger und Transkriptionsaktivator (engl.: <u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription)
TACE	TNF- $\alpha$ konvertierendes Enzym (engl.: <u>t</u> umor necrosis factor <u>a</u> lpha <u>c</u> onverting <u>e</u> nzyme)
TIMP	Gewebe-Inhibitor der Metalloproteinase (engl.: <u>t</u> issue <u>i</u> nhibitor of <u>m</u> etalloproteinase)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl.: <u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
THp-Zelle	T-Helfer Vorläufer-Zelle (precursor)
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	Gefäß-endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (engl.: <u>v</u> ascular <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule- <u>1</u> )
WT	Wildtyp (C57Bl/6)

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Abkürzungsverzeichnis**

### **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Rheumatoide Arthritis (RA)	3
2.1.1 Allgemein	3
2.1.2 Diagnostik der RA	4
2.2 Therapie der RA	5
2.2.1 Therapieprinzipien	5
2.2.2 Medikamentöse Therapie	5
2.3 Experimentelle Arthritismodelle	9
2.3.1 Allgemeines	9
2.3.2 Antigen-induzierte Arthritis (AIA)	10
2.3.3 Andere Arthritismodelle	12
2.3.4 Knockout-Modelle	13
2.4 Rolle der T-Zelle bei der RA	14
2.5 Interleukin-4 (IL-4)	18
2.5.1 Allgemein	18
2.5.2 IL-4 und Arthritis	20
2.6 Fragestellung	23
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1 Material	25
3.1.1 Versuchstiere	25
3.1.2 Geräte	25
3.1.3 Materialien	26
3.1.4 Chemikalien	26
3.1.5 Antikörper	27
3.1.6 Kulturmedien und Puffer	29
3.2 Methoden	31
3.2.1 Immunisierung und Arthritisinduktion	31
3.2.2 Erhebung klinischer Daten	31
3.2.2.1 Gelenkschwellung/Gewicht	31

3.2.2.2 Beurteilung der verzögerten Immunreaktion (DTH)	32
3.2.3 Histologie	32
3.2.4 Bestimmung der Serumimmunglobuline	34
3.2.4.1 Bestimmung der Gesamtimmunglobuline	34
3.2.4.2 Bestimmung der mBSA-spezifischen Antikörper	35
3.2.5 Präparation der Lymphknoten- und Milzzellen	36
3.2.6 Zellkultur	36
3.2.7 Bestimmung der Zytokine	37
3.2.8 Statistik	38
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1 Gelenkschwellung und Gewicht	40
4.2 Histologie	43
4.3 DTH-Reaktion	45
4.4 Serumantikörper	47
4.4.1 Immunglobuline zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion (Tag 0)	47
4.4.2 Immunglobuline 3 Tage AIA	49
4.4.3 Immunglobuline 8 Tage AIA	51
4.4.4 Immunglobuline 21 Tage AIA	52
4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Immunglobuline	54
4.5 Zytokine	55
4.5.1 Zytokine zum Zeitpunkt der Arthritis-Induktion	55
4.5.2 Zytokine nach 3 Tagen AIA	57
4.5.3 Zytokine nach 8 Tagen AIA	60
4.5.4 Zytokine nach 21 Tagen AIA	63
4.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Zytokine	66
<b>5. Diskussion</b>	<b>67</b>
5.1 Klinischer Verlauf (Gelenkschwellung und Gewicht)	68
5.2 Histologie der Kniegelenke	69
5.3 DTH-Reaktion	70
5.4 Serumantikörper	72
5.5 Zytokine	75
5.6 Schlussfolgerungen und zukünftige Fragestellungen	81
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>

## **7. Anhang**

Lebenslauf	98
Danksagung	100
Ehrenwörtliche Erklärung	101



## 1. Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische Bindegewebserkrankung, die in ihrer Genese und ihren Abläufen noch nicht vollständig erforscht ist. Für TH1-Zytokine konnte bei der RA ein krankheitsverstärkender und -unterhaltender Effekt nachgewiesen werden.

Um die RA in ihren Abläufen zu erfassen, bedient man sich verschiedener Tiermodelle, die im Verlauf, dem histologischen Bild und dem Ansprechen auf therapeutische Einflüsse mit der RA vergleichbar sind, z.B. das Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA).

TH1-Zytokine fördern die zelluläre Immunität, wohingegen die TH2-Zytokine ihre Wirkung v.a. über humorale Mechanismen entfalten. Die TH1- und TH2-Zytokine sind in einem System der wechselseitigen Beeinflussung eng miteinander verknüpft.

In einigen Studien konnte für Interleukin-4 (IL-4), dem charakteristischen Zytokin der TH2-Antwort, in verschiedenen Tiermodellen der Arthritis und anderer Autoimmunerkrankungen eine verlaufsmildernde Wirkung nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde in anderen Studien kein Einfluss oder sogar ein proinflammatorischer Effekt von IL-4 beschrieben.

Um den Einfluss von IL-4 auf den Verlauf der AIA zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit mehrere Zeitstudien mit IL-4-defizienten (IL-4-KO) C57Bl/6-Mäusen durchgeführt und die klinischen und immunologischen Parameter zu festen Zeitstufen erfasst.

Bei den klinischen Parametern, der Gelenkschwellung und dem Gewicht bestanden zwischen dem Wildtyp und der IL-4-KO-Maus nur in einer Studie in der akuten und chronischen Phase signifikante Unterschiede. Diese zeigten sich im Sinne einer stärkeren Gelenkschwellung der KO-Maus in der akuten Phase mit einer geringeren Schwellung in der chronischen Phase nach 21 Tagen. Somit konnten anhand der klinischen Parameter zwischen IL-4-KO und dem Wildtyp keine signifikanten Unterschiede reproduziert werden. Die zelluläre Immunität wurde anhand der DTH-Reaktion bestimmt, bei der auch nur in einer Studie bei der KO-Maus eine nicht reproduzierbare ausgeprägtere Reaktion gesehen werden konnte. Histologisch bestanden nur in einer Studie stärkere Zeichen der akuten Entzündung mit schwererer Destruktion nach 21 Tagen bei der KO-Maus. Die Immunglobuline wurden als unspezifische und mBSA-spezifische Antikörper bestimmt. Hierbei zeigte sich in zwei Studien bei den antigenspezifischen Antikörpern ein signifikant höherer IgG2a-Titer der KO-Maus und in allen Studien ein deutlich geringerer IgG1-Titer. Tendenziell konnte zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion bei den mBSA-spezifischen Antikörpern und zum Zeitpunkt 3 Tage AIA bei den unspezifischen- und mBSA-spezifischen Antikörpern eine TH1-Polarisierung gesehen werden. Auf Ebene der Zytokine lag die KO-Maus häufig mit dem IL-2-Spiegel deutlich über dem Wildtyp, der seinerseits zum Zeitpunkt der Induktion und nach 8 Tagen einen

signifikanten bzw. tendenziell höheren IFN- $\gamma$ -Spiegel hatte. Die TH2-Zytokine beim IL-4-KO waren in einigen Studien signifikant geringer als beim Wildtyp. Insgesamt bestand auf Zytokin- und Immunglobulinebene eine tendenzielle TH1-Polarisierung und ein Defekt der TH2-Immunität, welcher in den klinischen Parametern nicht zum Ausdruck kam.

Die Ergebnisse lassen Zweifel an dem ausschließlichen Antagonismus zwischen TH1- und TH2-Zytokinen und der antiinflammatorischen Wirkung von IL-4 im Modell der AIA aufkommen. Beide Mausstämme hatten nur geringe TH2-Zytokinspiegel, wobei die KO-Maus noch unter dem Wildtyp lag. Überrascht hat der zu zwei Zeitstufen höhere IFN- $\gamma$ -Spiegel des Wildtyps.

Als eine Ursache dieser Ergebnisse ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die schon durch die Immunisierung ausgeprägte TH1-Polarisierung dieses Modells anzunehmen. Für die DTH-Reaktion fungiert IL-4 nicht ausschließlich antagonistisch, sondern hat über eine Steigerung der Chemotaxis und der Leukozytenadhäsion eine wichtige verstärkende Funktion in der Effektorphase der DTH-Reaktion nach lokaler oder systemischer Gabe des Antigens. Die Bedeutung von IL-4 für die Ausbildung bestimmter Immunglobulin-Subklassen muss auch etwas relativiert werden, da diese Funktion zum Teil von anderen TH2-Zytokinen wie IL-13 und IL-5 ersetzt werden kann.

Nach Aktivierung über CD40-CD40L kann IL-4 über eine Steigerung der IL-12-Produktion eine Polarisierung zugunsten eines TH1-Zytokinmusters induzieren. Hieraus folgt, dass ein IL-4-Knockout zwar ein Wegfall eines supprimierenden Elementes bedeutet, gleichzeitig aber auch die TH1-Strecke geschwächt werden kann. So können die widersprüchlichen Daten einer tendenziellen TH1-Polarisierung der KO-Maus mit in zwei Studien geringeren IFN- $\gamma$ -Spiegeln interpretiert werden. Dies fügt sich in Studien anderer Arbeitsgruppen ein, die für IL-4 einen proinflammatorischen Effekt in verschiedenen experimentellen Modellen nachweisen konnten.

Mit zunehmendem Wissen über die starke proinflammatorische Wirkung von IL-17 und eine z.T. antiinflammatorische IFN- $\gamma$ -Wirkung bei Tiermodellen von Autoimmunerkrankungen, änderte sich die Sichtweise erheblich. Die AIA gilt nicht mehr als von TH1-Zellen unterhaltene Erkrankung, sondern ist in hohem Maße abhängig von der TH17-Zelle. IL-4 und IFN- $\gamma$  haben in diesem neuen Paradigma eine modulierende und TH17-hemmende Funktion. Aus dieser neuen Sicht ergeben sich spannende Aspekte für zukünftige Therapien.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Rheumatoide Arthritis (RA)**

#### 2.1.1 Allgemein

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische Bindegewebserkrankung, welche häufig zuerst symmetrisch die kleinen Gelenke von Händen und Füßen befällt (mit Ausnahme der distalen, interphalangealen Gelenke) und sich nach proximal ausbreitet. Der Beginn der Krankheit verläuft meist schubweise und schleichend mit unspezifischen Symptomen wie Schwäche, Unwohlsein, Muskel- und Gelenkschmerzen. Atypische Befallsmuster der Gelenke und früher Befall extraartikulärer Strukturen sowie rasch progrediente Verläufe sind möglich. Histologisch zeigt sich in der Frühphase der Erkrankung eine Synovialitis mit einem Infiltrat aus Granulozyten und mononukleären Zellen. Über eine Proliferation der Synoviozyten und des umgebenden Gewebes schreitet diese meist zur Zerstörung der Gelenkstruktur nach Jahren fort ( Lipsky 1995; Riede 2004).

Mit einer Prävalenz von ca. 1% ist die RA die häufigste systemische Autoimmunerkrankung, wobei Frauen dreimal häufiger betroffen sind als Männer. Die Prävalenz der RA nimmt mit zunehmendem Alter zu, wohingegen der Geschlechterunterschied abnimmt. Bei Erkrankten ist die statistische Lebenserwartung um 5-10 Jahre reduziert, wobei Todesursache meist Komplikationen der RA, wie Infektionen und Nierenerkrankungen sind. Die jährlichen Gesamtkosten für die medizinische Behandlung eines Patienten mit RA betragen in den USA durchschnittlich 9519 US- Dollar, wobei je nach Therapie erhebliche Unterschiede bestehen (Bernhard 2001, Gabriel et al. 2003, Michaud et al. 2003).

Die Ätiologie der RA ist noch weitgehend unklar. Durch Studien wurde in einigen Familien und Bevölkerungsgruppen eine Assoziation zwischen der Expression eines bestimmten Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC II) bzw. Human Leukocyte Antigens (HLA) und dem Auftreten der RA gefunden, so exprimierten 70% der RA-Patienten HLA-DR4, was in einer Kontrollgruppe nur zu 28% exprimiert wurde. Die Korrelation ist nicht exklusiv auf das HLA-DR4-Antigen beschränkt, sondern trifft bei einer großen Spanne von HLA-Antigenen zu. So wurde bei israelischen Juden und asiatischen Indern ein Zusammenhang zwischen der RA und HLA-DR1 gefunden und bei nordamerikanischen Yakima Indianern korrelierte die RA-Häufigkeit mit dem Vorhandensein von HLA-Dw16. Der Bereich auf den HLA-Antigenen, der für die Empfänglichkeit für die RA verantwortlich gemacht wird, liegt in der dritten hochgradig polymorphen Region der  $\beta$ -Kette des HLA-Antigens und besteht aus einer konstanten Reihe von Aminosäuren an den Positionen 67 bis

74, welche als Shared-Epitope bezeichnet wird. Die genaue Funktion dieses Shared-Epitopes ist bisher unklar. Diskutiert wird eine Rolle bei der Bindung eines unbekannten arthritogenen Peptides, eine Funktion für das Überleben autoreaktiver T-Zellklone und verschiedene andere Theorien. Die Ausbildung einer Arthritis ist über die HLA-Antigene eng mit der T-Zellfunktion verbunden (Lipsky 1995; Feldmann et al. 1996; Firestein 2003). In einigen Studien wurde eine Korrelation zwischen der Ausprägung bestimmter HLA-Antigene und dem Verlauf, dem Befallsmuster und dem Auftreten von für die RA spezifischen CCP-Antikörpern (citrullinated cyclic peptide -Antikörper) beschrieben (Holmdahl 2000; Weyand, Goronzy 2000; van Gaalen et al. 2004).

Das HLA-Antigen ist aber nur für ein Drittel der RA-Empfänglichkeit in Betracht zu ziehen (John, Worthington 2001). Unklar bleibt weiterhin, was letztlich in den genetisch prädisponierten Personen zum Ausbruch der Krankheit führt. Ein einzelnes bakterielles oder virales Antigen konnte noch nicht verifiziert werden, wird aber vermutet. Letztlich kommt es, ausgehend von im Gelenk befindlichen Autoantigenen wie Kollagen Typ II und der Glucose-6-Phosphat-Isomerase, zu einer unspezifischen entzündlichen Reaktion, welche von CD4<sup>+</sup>T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen über Zytokine aufrechterhalten wird. Im Laufe dieser Entzündungskaskade kommt es zu Immunkomplexablagerungen und zur Komplementaktivierung, welche in ihrem Verlauf zur Zerstörung von Knorpel und Knochen führen. (Lipsky 1995; El-Gabalawy, Lipsky 2002; Firestein 2003; Riede et al. 2004).

### 2.1.2 Diagnostik der RA

Die Diagnose der RA erfolgt anhand von Kriterien, die das American College of Rheumatology (ACR) 1987 erstellt hat (Arnett et al. 1988).

#### ACR-Kriterien:

1. Morgensteifigkeit im Bereich der Gelenke von mindestens einer Stunde Dauer
2. Arthritis an drei oder mehr Gelenkregionen
3. Arthritis der Gelenke der Hand an Metakarpophalangeal- und/oder proximalen Interphalangealgelenken
4. Symmetrische Befallsmuster der Gelenke
5. Subkutane Knoten über prominenten knöchernen Stellen, Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich (Rheumaknoten)
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Patientenserum
7. Typische radiologische Veränderungen an den Handgelenken

Die Diagnose einer Rheumatoiden Arthritis gilt als gesichert, wenn mindestens vier der sieben Kriterien erfüllt sind. Die Kriterien 1.-4. müssen über einen Zeitraum von sechs Wochen vorhanden sein.

Häufig ist eine Diagnose der RA in der Frühphase nicht möglich, daher wird verstärkt nach serologischen Parametern gesucht, welche eine Diagnose vor Ausbruch klinischer Symptome ermöglichen. Die CCP-Antikörper (citruinated cyclic peptide-Antikörper) haben eine Spezifität von 98% und eine Sensitivität von 68-80% und gelten als vielversprechender Marker für die frühe Diagnose und Vorhersage des Krankheitsverlaufes der RA. Die CCP-Antikörper konnten in Patientenseren z.T. Jahre vor dem Ausbruch klinischer Symptome der RA nachgewiesen werden. Andere Autoantikörper wie die BiP-Antikörper (heavy chain binding protein) oder die Antikörper gegen die Glucose-6-Phosphat-Isomerase waren mit 97 bzw. 95% recht spezifisch, hatten aber nur eine Sensitivität von maximal 68 bzw. 64% (van Boekel et al. 2002; van Gaalen et al. 2004; Zendman et al. 2004).

## **2.2 Therapie der RA**

### 2.2.1 Therapieprinzipien

Da es für die RA keine kurative Therapie gibt, sind die Hauptziele der Behandlung eine Remission der Symptome, eine Aufrechterhaltung der erzielten Remission und der Erhalt der Funktion der betroffenen Gelenke. Parallel zu einer medikamentösen Therapie sollte früh angestrebt werden, mit physikalischen und physiotherapeutischen Maßnahmen die Beweglichkeit betroffener Gelenke zu erhalten und den Patienten dabei zu unterstützen, in seiner häuslichen Umgebung und im Alltag möglichst lange selbstständig zu bleiben. Der operative Eingriff sollte nur als ultima ratio im Falle unkontrollierbarer Beschwerden und bei starken Bewegungseinschränkungen in Betracht gezogen werden.

### 2.2.2 Medikamentöse Therapie

#### **NSAIDs**

Zu Beginn der Therapie sollte bis zur Diagnosesicherung bzw. bis zum Einsetzen der Wirkung langsamer wirkender Medikamente mit nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAIDs -nonsteroidal antiinflammatory drugs) behandelt werden, um eine möglichst schnelle Minderung des Leidensdruckes herbeizuführen. Die Progression der Erkrankung kann mit NSAIDs nicht aufgehalten werden. Wirkstoffe aus dieser Gruppe sind

z.B. die unselektiven Cyclooxygenase-Inhibitoren wie Diclofenac oder die selektiven Hemmer der Cyclooxygenase 2, z.B. Etoricoxib.

### **Glucocorticoide**

Glucocorticoide sind sehr gute entzündungshemmende Medikamente, welche die Beschwerden des Patienten rasch lindern und das Fortschreiten der radiologischen Veränderungen vermindern können. Wegen dosisabhängiger Nebenwirkungen wie Osteoporose, Hypertension, pathologischer Glucosetoleranz und anderer sind Glucocorticoide für die Langzeittherapie nur bei strenger Indikationsstellung Mittel der Wahl.

### **Niedermolekulare DMARDs**

Als disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) wird eine heterogene Medikamentengruppe bezeichnet, welche z.T. schon seit den 20er Jahren bekannt ist. Sie sind in der Lage, den Entzündungsprozess zu unterdrücken und die Schädigung der Gelenke aufzuhalten. Die Therapie mit DMARDs sollte möglichst früh nach Diagnosestellung begonnen werden, da die Zeit bis zum Wirkungseintritt je nach Präparat 1-6 Monate betragen kann. Falls mit einem einzelnen Präparat keine ausreichende Krankheitskontrolle erreicht werden kann, können auch Kombinationen aus zwei oder drei DMARDs angewandt werden. Als „klassische“ DMARDs werden verwandt: Methotrexat, welches immer noch als „Goldstandard“ der Therapie gilt, Sulfasalazin, intramuskuläres Gold, Penicillamin und das Antimalariamittel Hydroxychloroquin, das von den genannten den geringsten therapeutischen Effekt hat. Ein neueres Medikament der o.g. Gruppe ist das Leflunomide, das über eine Hemmung der de-novo-Synthese von Pyrimidinen in aktivierten Lymphozyten antiproliferativ wirkt und eine Alternative zu Methotrexat bietet.

Die genaue Wirkungsweise der meisten DMARDs ist bis heute weitgehend unklar (ACR 1996,2002; Smolen, Steiner 2003; Cronstein 2004; O'Dell 2004).

### **Biologische DMARDs**

Mit dieser neuen Gruppe von Medikamenten wird versucht, proinflammatorische Zytokine und Oberflächenmoleküle auf Zellen spezifisch zu blockieren oder herunterzuregulieren. Die Blockade/Regulation proinflammatorischer Zytokine wird über verschiedene Mechanismen erreicht.

1. Bindung des proinflammatorischen Zytokins über spezifische Antikörper, lösliche Rezeptoren oder Blockade des zugehörigen Rezeptors durch Rezeptorantagonisten.

2. Verwendung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10 oder IL-13, um die Entzündungsreaktion einzudämmen.

3. Die Anwendung spezifischer Antikörper, welche gegen Zelloberflächenstrukturen gerichtet sind und dort zur Elimination der Zelle oder ihrer funktionellen Einschränkung führen.

Von den genannten Mechanismen ist bisher der erste der therapeutisch erfolgreichste. Besonders durch die Blockade der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 und ihrer Rezeptoren konnten gute therapeutische Erfolge erreicht werden.

Zur Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie kommen Antikörper gegen membrangebundenes TNF- $\alpha$  wie *Infliximab* und Antikörper gegen membrangebundenes und lösliches TNF- $\alpha$  wie *Adalimumab* zum Einsatz. *Etanercept*, welches die erste biologische DMARD war, besteht aus einem Fusionsprotein, aus einem löslichen dimeren TNF-Rezeptorprotein und dem F<sub>c</sub>-Fragment eines humanen IgG1- Antikörpers. Es ist gegen TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  gerichtet.

Die Blockade des proinflammatorischen Interleukin-1 wird therapeutisch durch das Medikament *Anakinra*, eine rekombinante Form des physiologisch vorkommenden IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra), bewirkt.

In Kombination mit Methotrexat konnte mit biologischen DMARDs z.T. ein positiv- additiver Effekt gefunden werden.

Den recht viel versprechenden Ergebnissen in der Therapie der RA gegenüber stehen die sehr hohen Therapiekosten und das erhöhte Infektionsrisiko während der Behandlung. Während der Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie wurden gehäuft Exazerbationen vorbestehender Infektionen, wie einer Tuberkulose beschrieben. Auch konnte eine Verbindung mit dem gehäuftem Auftreten von Lymphomen und demyelinisierenden Erkrankungen nicht sicher ausgeschlossen werden. Ca. 30% der Patienten mit einer Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie sind Nonresponder

*Rituximab* ist ein Antikörper, der gegen das CD20-Protein der B-Zelle gerichtet ist und früher bei der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzt wurde. In der Therapie der RA konnten durch dieses Medikament, selbst bei Versagen der TNF- $\alpha$ -Blocker, deutliche klinische und radiomorphologische Verbesserungen erreicht werden (Brodzsky et al. 2007).

Aus Anteilen des Immunglobulin G und Anteilen des T-Lymphozyten-assoziierten Proteins 4 der cytotoxischen T-Zellen wurde das Fusionsprotein CTLA4-Immunglobulin (*Abatacept*) entwickelt. Durch dieses Medikament wird die Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen verhindert. Bei Versagen einer Methotrexat-Therapie und

fehlendem Ansprechen auf TNF- $\alpha$ -Blocker konnten durch *Abatacept* eine deutliche Reduktion des Gelenkschadens bei RA-Patienten beobachtet werden (Harigai 2007).

### **Zukünftige DMARDs**

Viele der Kandidaten für zukünftige Therapieformen sind Enzyminhibitoren. Sie entfalten ihre Wirkung über die Blockade gewebsschädigender Enzyme, wie die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) oder inhibieren Enzyme, die aktivierte Zytokine aus Vorläuferstufen oder von Zelloberflächen freisetzen. Ein dritter Wirkungsmechanismus ist die direkte Einflussnahme von Enzyminhibitoren auf die Enzyme der Signaltransduktionskaskade (ACR 1996,2002; Smolen, Steiner 2003; Cronstein 2004; O'Dell 2004).

### **Experimentelle Therapieansätze**

Mit dem Aufkommen der Biological-Therapie wurden in der Therapie der entzündlichen Gelenkerkrankungen große Fortschritte erzielt. Grundlage dieser Therapien waren viele Studien, die zum Verständnis des immunologischen Pathomechanismus beigetragen haben. Die Identifikation neuer Entzündungsfaktoren/-mediatoren und ihrer Funktion führt zur Entwicklung neuer Therapieansätze, die idealerweise folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Kontrolle der Entzündung, 2. Modulation der zugrunde liegenden Fehlfunktion des Immunsystems und die Wiederherstellung der Immuntoleranz, 3. Schutz der angegriffenen Gewebe, um eine Heilung zu ermöglichen, 4. Aufrechterhaltung des Immunsystems, um eine Immunsuppression und die hierdurch entstehende Infektanfälligkeit bzw. die Aktivierung bestehender Infekte zu vermeiden und 5. die mit entzündlichen Gelenkerkrankungen vergesellschafteten Erkrankungen zu verbessern.

Eine Therapiestrategie, die in Studien z.T. erfolgreich getestet wurde, ist die Anti-CD4-Therapie, welche im Tierexperiment zu einer Beeinflussung bzw. Besserung der Symptomatik führte (Pohlers et al. 2002, 2004).

Die Blockade weiterer proinflammatorischer Zytokine ist bereits Bestandteil der klinischen Praxis und ihre Praxistauglichkeit wird in klinischen Studien weiter ausgebaut. Für Interleukin-6-Rezeptorantagonisten konnte in klinischen Studien eine dosisabhängige Reduktion der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (Choy et al. 2002; Nishimoto et al. 2004). Der Interleukin-6-Rezeptorantagonist *Tocilizumab* wurde bereits in klinischen Phase II-Studien erfolgreich getestet und gilt als aussichtsreicher Kandidat, die steigende Zahl der Biologicals zu ergänzen (Mukai 2007; Smolen et al. 2007)



Durch Anti-IL-12-Antikörper, besonders in Kombination mit einer Anti-TNF-Therapie, wurde bei der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) eine geringere Schwere des Verlaufes und eine geringere Gelenkdestruktion nachgewiesen (Butler et al. 1999). In klinischen Phase II-Studien wird ein Inhibitor der IL-12- und IL-23-Produktion getestet (*Apilimod*), der bei der Morbus Crohn-Therapie bereits eine gute Krankheitskontrolle gezeigt hat. Vorteil dieser Therapie wäre unter anderem die orale Applikation des Medikamentes (Billich 2007).

Eine Blockade von IL-18 durch spezifische Antikörper oder ein genetisches Knockout führte in der CIA zu einer geringeren Inzidenz und zu mildereren Krankheitsverläufen (Wie et al. 2001; Plater-Zyberk et al. 2001).

Die Anwendung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 konnte sich aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit von positiven Effekten bisher nicht als Therapieoption durchsetzen.

Aufgrund vielversprechender Studienergebnisse hat der Therapieansatz der Blockade der Knochendestruktion durch eine Hemmung der Osteoklastenaktivierung durch RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B Ligand) viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Der RANK-Rezeptor der Osteoklasten führt zu einer Zunahme der Knochendestruktion. Diese Hemmung wird durch den Decoy-Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) vermittelt und führte in Studien zu deutlich reduzierter Knochendestruktion (Kong et al. 1999; Pettit et al. 2001; Bolon et al. 2002; Redlich et al. 2002; Tanaka 2007).

## **2.3 Experimentelle Arthritismodelle**

### 2.3.1 Allgemeines

Aufgrund der noch vielen offenen Fragen zu Ursache, Frühphase, Verlauf und Therapiemöglichkeiten der RA ist es erforderlich, anhand von Tiermodellen, unter kontrollierten Bedingungen weiter zu forschen. Hierzu steht eine Vielzahl von experimentellen Arthritismodellen zur Verfügung, von denen hier nur einige und insbesondere das in dieser Arbeit verwendete erwähnt werden sollen.

Einen großen Fortschritt für das Verständnis immunologischer und autoimmunologischer Prozesse bedeutete das 1989 durch Thompson und Kollegen (Review: Koller, Smithies 1992) entwickelte Knockout-Modell, welches es ermöglichte, gezielt Gene und somit ihre Produkte auszuschalten. Diese Technik wurde möglich, indem man die Zucht multipotenter Stammzellen und das Einfügen von Mutationen durch homologe Rekombination verband.

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte nur auf natürlich vorkommende Mutationen wie die SCID-Maus (Severe Combined Immunodeficiency) und die thymusaplastische Nude-Maus zurückgegriffen werden (Mak et al. 2001).

### 2.3.2 Antigen-induzierte Arthritis (AIA)

Das in dieser Arbeit verwendete Modell der AIA wurde erstmals 1962 von Dumonde und Glynn (1962) in Kaninchen beschrieben und im weiteren Verlauf durch Loewi (1968) in Meerschweinchen, Brackertz et al. (1977 a, b, c) in Mäusen, Griffiths et al. (1992) in Ratten und Highton et al. (1999) in Schafen etabliert.

Zur Induktion einer Immunantwort wird den Tieren ein in komplettem Freund'schen Adjuvans gelöstes Proteinantigen subkutan injiziert. Durch gleichzeitige intraperitoneale Applikation von abgetöteten *Bordetella pertussis* kann die Immunogenität des Proteinantigens verstärkt werden (Hunneyball et al. 1986a,b). Nach 7 Tagen erfolgt durch eine erneute Antigen-Injektion eine Boosterung der Immunantwort. Durch die Immunisierung wird eine zelluläre und humorale Hyperreaktivität gegen das eingesetzte Protein induziert.

In dieser Arbeit wird als Proteinantigen methyliertes bovines Serumalbumin (mBSA) verwendet, da durch das kationische Protein eine langfristige Bindung an die negativ geladenen Knorpelmatrix erreicht werden kann und dadurch eine Chronifizierung der Entzündungsreaktion ermöglicht wird (van den Berg et al. 1982,1984).

Die Induktion der Arthritis erfolgt durch intraartikuläre Injektion des Antigens 14 Tage nach der zweiten Immunisierung, wodurch eine Monarthritis in diesem Gelenk ausgelöst wird. Das injizierte Antigen bildet mit den vorhandenen zirkulierenden Antikörpern in einer Arthus-Reaktion Immunkomplexe und initiiert so die Komplementkaskade und die akute Entzündungsreaktion.

Die nun ausgelöste Reaktion erfüllt klinisch mit einer Gelenkschwellung, Überwärmung, Rötung und Schmerzen die Kriterien einer Entzündung. Histologisch zeigt sich das Bild der in typischen Phasen ablaufenden RA, wobei es in den Tagen nach der Induktion zu einem Gewebsödem mit Fibrin, Erythrozyten im Rahmen der Hyperämie und zu einer Einwanderung von Granulozyten kommt. Bereits in dieser frühen Phase beginnt der Knorpelabbau durch Chondrozytennekrose und Hemmung der Proteoglykansynthese (van den Berg et al. 1981). Henzgen et al. konnten bereits nach wenigen Stunden elektronenmikroskopisch erste Knorpelschäden darstellen (Henzgen et al. 1996).

Der Wandel von der akuten in die chronische Phase ist durch einen Rückgang des akuten Infiltrates und einer zunehmenden Infiltration der Synovialmembran durch mononukleäre und polymorphnukleäre Zellen gekennzeichnet, die zu einer Hypertrophie und Hyperplasie der Synovialmembran führen. Charakteristisch ist die Ausbildung eines Pannus, einer Proliferation der Synovialmembran, welche unter Zerstörung des Knorpels im Verlauf bis in den subchondralen Markraum reichen kann.

Bereits 1977 konnten Brackertz et al. in T-Zell-defizienten Nude-Mäusen nachweisen, dass die AIA nicht ausgelöst werden kann und somit T-Zell-abhängig ist. Nach Transfer immunkompetenter T-Zellen war eine Entzündung auslösbar (Brackertz et al. 1977b). Ebenso konnte gezeigt werden, dass nach Lymphozytentransfer von arthritischen Mäusen auf SCID-Mäuse eine AIA ausgelöst werden konnte. Nach Depletion der  $CD4^{+}$ T-Zellen vor dem Transfer blieb nach der akuten Synovitis der chronisch-destruierende Verlauf aus (Petrow et al. 1996). Ein weiterer Beleg für die bedeutende Rolle der  $CD4^{+}$  T-Zelle ist die Effektivität einer gegen  $CD4^{+}$  oder T-Zellen gerichteten immunsuppressiven Therapie (Bräuer et al. 1994; Pohlers et al. 2004).

Humorale Immunmechanismen spielen eine wichtige Rolle in der akuten Phase. Im Serumtransfer konnte durch das Serum arthritischer Tiere in den Rezipienten eine akute Gelenkschwellung, aber keine Chronifizierung der Entzündung induziert werden (Brackertz 1977c).

Die AIA stellt ein wichtiges und etabliertes Modell der RA dar, da die Arthritis nach Immunisierung mit 100% Inzidenz induziert werden kann und durch einen der RA entsprechenden schubweisen Verlauf gekennzeichnet ist. Ein ähnlicher Verlauf konnte nur in der Streptokokkenzellwand-induzierten Arthritis reproduziert werden (Esser et al. 1985).

In der chronischen Phase der AIA kann durch erneute intraartikuläre (Lens et al. 1984a, Buchner et al. 1995), intravenöse (Lens et al. 1984 a,c, 1986) oder orale (Lens et al. 1984b) Gabe des Antigens ein Flare-up-Phänomen erreicht werden, das dem akuten Schub des RA-Patienten entspricht.

Das histologische Bild der AIA entspricht in hohem Maße der RA. Durch den gut reproduzierbaren und einheitlichen Zeitverlauf besteht in der AIA die Möglichkeit, spezifisch in der akuten oder chronischen Phase Prozesse zu beschreiben und gezielt Therapieversuche durchzuführen.

Das Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie ist bei der AIA und der RA auch vergleichbar, wodurch sich die AIA gut für Therapiestudien eignet (Crossley et al. 1989).

Durch die fehlende MHC II-Restriktion kann die AIA in fast allen Mausstämmen induziert werden und eignet sich daher gut für Studien mit transgenen und Knockout-Stämmen.

Im Unterschied zur RA ist die AIA aber nur eine Monarthritis und es fehlt in der Histologie die Ausbildung ektopischer Lymphfollikel in der Synovialmembran.

### 2.3.3 Andere Arthritismodelle

#### Adjuvans-Arthritis (AA)

Das erste beschriebene Tiermodell der RA ist die AA, welche durch einmalige subkutane Gabe eines mit *Mycobacterium tuberculosis* supplementierten Freund'schen Adjuvans induziert wird (Pearson 1956). Nach 10-45 Tagen entwickelt sich eine Arthritis, die meist nach einem Monat wieder abklingt. Die wichtigsten pathologischen Merkmale dieser Entzündung sind die Ödembildung, die Gelenkinfiltration durch mononukleäre/polymorphnukleäre Zellen, die Ausbildung eines Pannus, die Periostitis und die Erosion von Knorpel und Knochen.

An der Ausbildung der Arthritis ist eine T-Zell-vermittelte Kreuzreaktion zwischen Zellwandbestandteilen der *Mycobacterien* und Autoantigenen, wie Hitze-Schock-Proteinen (HSP 65) oder Knorpelproteoglykanen beteiligt (Holmdahl et al. 1992).

#### Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)

Die CIA wurde bereits bei Ratten, Mäusen und Affen beschrieben und entsteht spontan nach subkutaner Injektion von Typ II Kollagen in inkomplettem oder komplettem Freund'schen Adjuvans (Trentham et al. 1977, Ratten; Courtenay et al. 1980, Mäuse; Yoo et al. 1988, Affen).

Inzidenz und Krankheitsbeginn in der CIA variieren in Abhängigkeit von den Mausstämmen, der Herkunft des Antigens und von Umwelteinflüssen (Brebant et al. 1993; Brand et al. 1996).

#### Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis (SCWIA)

Durch intraperitoneale Injektion von Zellwandbestandteilen von *Streptococcus pyogenes* kann in suszeptiblen Rattenstämmen eine Polyarthritis induziert werden (Cromartie et al. 1977).

Die Empfänglichkeit für die SCWIA variiert bei verschiedenen Rattenstämmen, so entwickeln Lewis-Ratten (LEW/N) eine schwere chronisch verlaufende Entzündung, wohingegen histokompatible Fischer-Ratten (F344/N) eine rasch verlaufende milde Arthritis zeigen. Die

Ursache dieses unterschiedlichen Ansprechens ist auf einen Defekt in der Synthese des Kortikotropin-Releasing-Faktors bei Lewis-Ratten zurückzuführen, der zu einer nicht optimalen Aktivierung der Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere führt (Sternberg et al. 1989 a,b).

#### TZR-Transgene Arthritis

Die für den T-Zell-Rezeptor transgenen K/BxN Mäuse, die aus einer Kreuzung aus Tieren mit transgenem T-Zell-Rezeptor (TZR) und NOD- (non-obese diabetes-) Mäusen hervorgegangen sind, entwickeln eine spontane Polyarthrititis. Pathomechanismus sind Autoantikörper, für die die Glucose-6-Phosphat-Isomerase als Antigen fungiert (Korganow et al. 1999; Matsumoto et al. 1999). Die Tiere entwickeln ab dem Alter von 3 Wochen eine schwere Arthritis, die T- und B-Zell-abhängig ist (Schubert et al. 2004).

#### Human-murine SCID-Arthritis

Humane Synovialmembran bzw. Synoviozyten von RA-Patienten werden in die Kniegelenke von SCID-Mäusen transferiert, wodurch eine mehrphasig verlaufende Monarthrititis ausgelöst wird. Nach 35 Tagen bilden sich an der Bindungsstelle zwischen der transferierten synovialen Schicht und dem Maus-Knorpel Erosionen und nach 105 Tagen hat sich ein Pannusgewebe aus synovialen Fibroblasten in den Knorpel gedrängt ( Sack et al. 1994, 1996). Geiler et al. (1994) induzierte die Human-murine SCID-Arthritis durch Koimplantation von RA-Gewebe und humanem Knorpel in SCID-Mäuse.

#### 2.3.4 Knockout-Modelle

Die Funktion eines Genes und seines Produktes ist nur vollständig zu verstehen, wenn Tiere zur Verfügung stehen, die das Gen aufgrund einer Mutation nicht exprimieren. Das Ausschalten von bestimmten Gensequenzen wurde durch die Kombination aus homologer Rekombination und der Zucht pluripotenter embryonaler Stammzellen ermöglicht. Die ersten Knockout-Tiere wurden 1989 von Thompson et al. beschrieben (Review:Koller, Smithies 1992).

Bei der homologen Rekombination wird eine funktionslose Kopie des Zielgens kloniert und dann in embryonale Stammzellen eingeschleust. Meist wird die manipulierte Genkopie an ein Gen gekoppelt, das die Resistenz gegen ein Antibiotikum (z.B. Neomycin) kodiert. Die erfolgreiche Einschleusung der Genkopie kann in der Zellkultur durch die exprimierte

Resistenz gegenüber dem Antibiotikum nachgewiesen und die entsprechenden Zellen können selektiert werden.

Die Antibiotikumresistenz beweist nur den Einbau der Information in das Genom, nicht aber die homologe Rekombination. Um diese nachzuweisen, wird an das Ende des einzubauenden Genkonstruktes die Gensequenz für die Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus (HSV-tk) angehängt, die bei einer homologen Rekombination verloren geht. Bei Einbau an einer zufälligen Lokalisation des Genoms bleibt die HSV-tk erhalten und wird exprimiert, was zu einer Sensibilität gegenüber der antiviralen Substanz Ganciclovir führt. Hieraus folgt, dass eine erfolgreiche homologe Rekombination durch eine Resistenz gegen das Antibiotikum und die antivirale Substanz nachgewiesen werden kann.

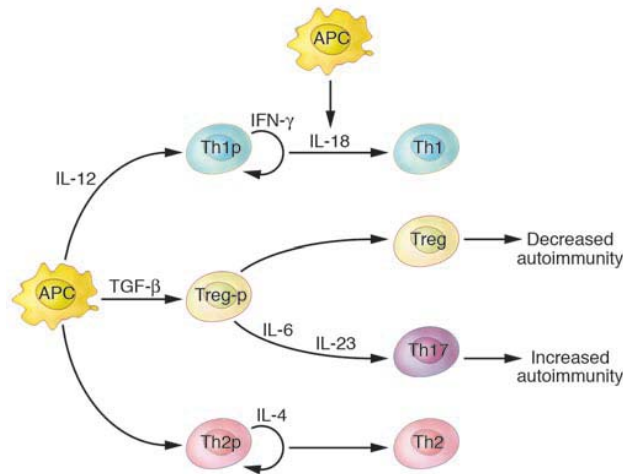
Durch Injektion des mutierten Gens in eine Blastocyste, die in den Uterus eingesetzt wird, kann das Gen in vivo ausgeschaltet werden. Das modifizierte Gen wird in den Embryo integriert und nimmt an der Ausbildung aller Gewebe teil. Durch weitere Kreuzungen unter den entstandenen chimären Tieren kann eine homozygote Ausprägung des Genknockouts erreicht werden. (Janeway 2002)

Die in dieser Arbeit verwendeten IL-4-Knockout C57BL/6-Mäuse wurden in der oben beschriebenen Weise von Kopf et al. generiert (Kopf et al. 1993).

## **2.4 Rolle der T-Zellen bei der RA**

Naive  $CD4^+$  T-Zellen können sich in Abhängigkeit von dem sie umgebenden Zytokinmilieu in verschiedene Subpopulationen differenzieren (Abb. 1). Bei murinen  $CD4^+$  T-Zellen konnte dies in vivo und in vitro demonstriert werden. In Anwesenheit von IL-12 entwickeln sich durch den Transkriptionsfaktoren T-Bet und STAT-4 (signal transducer and activator of transcription-4) eine TH1-Zelle. IL-4 führt über GATA-3 und STAT-6 zur TH2-Antwort. TGF- $\beta$  aktiviert in Gegenwart von IL-2 und Foxp3 die Ausbildung von regulatorischen T-Zellen (Treg), in Kombination mit IL-6 und ROR- $\gamma$ T wird die Bildung von TH17-Zellen gefördert (Afzali et al. 2007). Gewebespezifische Autoimmunerkrankungen wie die RA resultieren aus einem Verlust der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen, der zu einer Ausbreitung autoreaktiver, immunologischer Effektorzellen führt. Am Anfang dieser Entwicklung stehen Antigen-präsentierende Zellen (antigen-presenting cells APC), die über die MHCII-vermittelte Antigenpräsentation, Adhäsion und kostimulatorische Oberflächenmoleküle und die Zytokinsekretion die Differenzierung von aktivierten

Lymphozyten zu T-Zell-Subpopulationen vermittelt. Die Subpopulation der T-Zellen ist hierbei vom sezernierten Zytokin abhängig (Abb. 1) (Gutcher, Becher 2007).



**Abb.1** Durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) induzierte, zytokingesteuerte Differenzierung von naiven T-Zellen (precursor p) zu Effektorzellen (Quelle: Gutcher, Becher 2007).

## TH1/TH2-Zellen

1986 wurden die  $CD4^+$ T-Zellen anhand ihrer charakteristischen Zytokinproduktion von Mosmann et al. in 2 Subpopulationen, die T-Helfer 1- (TH1) und T-Helfer 2 (TH2)-Zelle unterteilt. Die TH1-Zelle vermittelt die zelluläre Immunität über  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\beta$  und IL-2. Die TH2-Zelle ist über IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 Träger der humoralen Immunität (Mosmann et al. 1986; Coffman 2006). Die Polarisierung der T-Zell-Antwort in Richtung TH1 oder TH2 ist abhängig von der Zytokinproduktion der APC. IL-12 und IL-18 führen zu einer TH1-dominierten Immunantwort, wohingegen die TH2-Antwort in hohem Maße von IL-4 abhängig ist. Die TH1- und TH2-Antwort inhibieren sich gegenseitig durch ihre spezifischen Zytokine (Hsieh et al. 1992,1993; Yoshimoto et al. 1998).

Bereits Brackertz et al. konnten 1977 in ihren Untersuchungen die Abhängigkeit der Ausbildung einer AIA von der T-Zelle nachweisen (Brackertz et al. 1977 a,b,c) und nach der Einteilung in die TH1- und TH2-Subtypen wurde die pathogenetische Bedeutung der TH1-Zelle für die Schwere der Arthritis mehrfach nachgewiesen. Der TH2-Zelle wurde in diesem

dichotomen Bild eine mildernde, entgegengesetzte Wirkung zugeordnet (Firestein et al. 1990 a,b; Jacobs et al. 1994).

#### TH17-Zellen

Die Allgemeingültigkeit des Konzepts einer dichotomen Zuordnung der TH1-Zelle zur Entwicklung einer gewebespezifischen Autoimmunerkrankung und der TH2-Zelle als deren Widersacher wurde in den letzten Jahren aufgrund experimenteller Daten zunehmend in Frage gestellt.

Bereits 1989 hatten Jacob et al. in der Adjuvans-Arthritis einen heterogenen IFN- $\gamma$ -Effekt beobachtet. Bei Gabe von IFN- $\gamma$  24 Stunden vor Injektion des Adjuvans kam es zu einem deutlich schwereren Verlauf der Arthritis. Wurde IFN- $\gamma$  24 bis 48 Stunden nach der Adjuvans-Applikation verabreicht, verlief die Arthritis deutlich milder (Jacob et al. 1989).

Das Modell der experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE) ist, wie das der AIA, ein durch die Zytokine der TH1-Zelle getragenes Modell. Im Gegensatz zur Modellvorstellung entwickelten TNF- $\alpha$ -defiziente Mäuse eine dem Wildtyp vergleichbare EAE und beim IFN- $\gamma$ -Knockout und IFN- $\gamma$ -Rezeptor-Knockout war die Ausprägung der EAE deutlich verstärkt (Ferber et al. 1996; Frei et al. 1997).

Die Schwere der EAE konnte in immunisierten Mäusen durch einen Antikörper gegen IL-17 reduziert werden. Nach Behandlung der immunisierten Mäuse mit einem Anti-IL-23-Antikörper blieb die Entwicklung der EAE gänzlich aus (Langrish et al. 2005; Chen et al. 2006).

Ähnliche Befunde wurden von Irmeler et al. bei der AIA der IFN- $\gamma$ -Knockout Maus erhoben. Durch den IFN- $\gamma$ -Knockout entwickelten die Mäuse eine deutlich schwerer verlaufende Arthritis mit ausgeprägten Gelenkdestruktionen. Nach Injektion von exogenem IFN- $\gamma$  konnte der Verlauf der AIA abgemildert werden. Nach Injektion von IL-17-eliminierenden Antikörpern war die akute Entzündung deutlich geringer. In vitro wurde eine Inhibition der IL-17-Bildung durch IFN- $\gamma$  nachgewiesen, woraus geschlossen werden kann, dass IFN- $\gamma$  in der akuten Phase der AIA, entgegen der bisherigen Vorstellung, eine anti-inflammatorische Wirkung hat (Irmeler et al. 2007).

Die proinflammatorische Wirkung von IL-17 wurde bereits 1996 von Fossiez et al. beschrieben. In einer Kultur mit synovialen Fibroblasten von RA-Patienten wurden nach



Hinzugabe von IL-17 deutlich höhere Spiegel an IL-6, IL-8, Prostaglandin E<sub>2</sub> und G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) gemessen (Fossiez et al. 1996).

Langrish et al. beschrieben eine CD4<sup>+</sup>T-Zellpopulation, die sich durch ihre charakteristischen Zytokine IL-17, IL-17F, IL-6 und TNF auszeichnete und die als TH17-Zellen bezeichnet wurden. Die Entwicklung einer TH17-Antwort war in hohem Maße abhängig von IL-23 (Langrish et al. 2005).

IL-23 ist ein heterodimeres Zytokin, das sich aus einer p19- und p40-Untereinheit zusammensetzt. Obwohl IL-23 sich die p40-Untereinheit mit dem IL-12 teilt, wird durch IL-23 keine TH1-Antwort und keine erhöhte IFN- $\gamma$ -Ausschüttung induziert.

Mit zunehmender Erkenntnis über die wesentliche Funktion von IL-17 bei der Entwicklung und dem Verlauf einer Autoimmunreaktion häuften sich in den letzten Jahren die Studien, die diesen Effekt in verschiedenen Modellen, wie der EAE, der CIA und der allergischen Hypersensibilität der Luftwege nachwiesen (Lundy et al. 2007; Steinman 2007; Toh, Miossec 2007).

In einem IL-17-Knockoutmodell der EAE wurde durch Komiyama et al. trotz des fehlenden IL-17 eine geringe Ausprägung der EAE beobachtet (Komiyama et al. 2006). Es kann hier postuliert werden, dass die TH1-Zelle in der Frühphase der Ausbildung einer Autoimmunreaktion eine Rolle spielt, indem sie über IFN- $\gamma$  und TNF die Induktion des vaskulären Zell-Adhäsionsmoleküls 1 (vascular cellular adhesion molecule-1, VCAM-1) induziert. VCAM-1 bindet mit dem  $\alpha$ 4-Integrin Lymphozyten und ermöglicht so die Migration ins Entzündungsgebiet. Seine Bedeutung wurde in verschiedenen Modellen von Autoimmunerkrankungen, wie der EAE, dem Diabetes mellitus Typ1 der NOD-Maus und der CIA nachgewiesen (Yednock et al. 1992; Yang et al. 1993; Steinman 2005).

Eine hemmende Wirkung auf IL-17 haben IL-4 und IFN- $\gamma$ . Beschrieben wurde die IL-17-Hemmung durch IL-4 u.a. von Sarkar et al. im Modell des CIA. Nach genetischer Modifikation der dendritischen Zellen und hierdurch gesteigerter IL-4-Produktion war die Inzidenz und Schwere der CIA deutlich vermindert. Dieser Effekt wurde auf eine verminderte IL-17-Produktion von Milz-T-Zellen nach Kokultur mit IL-4-produzierenden dendritischen Zellen zurückgeführt und war auch durch Hinzugabe von IL-23 nicht aufzuheben (Alber, Kamradt 2007; Sarkar et al. 2007).

## Regulatorische T-Zellen (Treg-Zelle)

Die regulatorische T-Zelle (Treg-Zelle) hat in den letzten 10 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Treg-Zelle kann die Funktionen der Effektor-T-Zellen kontrollieren und entzündliche Autoimmunprozesse regulieren (Leipe et al. 2007). Es existieren einige phänotypisch unterschiedliche Typen der Treg-Zellen, welche alle als spezifische Marker eine hohe Oberflächenexpression von CD25 und in geringerem Maße CD103, LAG3 (lymphocyte activation gene 3) und Neuropilin haben (Bruder et al. 2004; Huang et al. 2004; Piccirillo, Thornto 2004). Treg-Zellen produzieren unter anderem hohe Spiegel an TGF- $\beta$  und IL-10 (Bluestone, Tang 2004).

Die Rolle der Treg-Zellen wurde in verschiedenen Tiermodellen der RA erforscht und hierbei wurde nachgewiesen, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Zellen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Entzündungsprozesses spielen. Frey et al. konnten im Modell der AIA zeigen, dass es nach der Arthritisinduktion zu einer deutlich stärkeren humoralen und zellulären Immunreaktion auf das verwendete Antigen kam, wenn bei den immunisierten Mäusen eine Depletion der CD25<sup>+</sup>Zellen vorlag. Ein adoptiver Transfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Zellen zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion milderte den Verlauf der Arthritis ab, konnte aber keinen Einfluss auf eine bestehende Arthritis nehmen (Frey et al. 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen waren Morgan et al. nach der Depletion der CD25<sup>+</sup>Zellen im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis gekommen (Morgan et al. 2003).

## 2.5 Interleukin-4 (IL-4)

### 2.5.1 Allgemein

Interleukin-4 wurde 1982 erstmalig von Howard et al. als B-Zell-Wachstumsfaktor (B-cell growth factor, BCGF) beschrieben, da es die DNA-Synthese in B-Zellen steigern kann, nachdem diese durch IgM stimuliert wurden (Howard et al. 1982). Mit zunehmender Erkenntnis über die pleiotrope Funktion dieses Zytokins wurde es in Interleukin-4 umbenannt. (Lee et al. 1986; Paul 1991). IL-4 führt zu einer verstärkten Expression von MHC II-Molekülen und niedrig-affinen IgE-Rezeptoren (Fc $\epsilon$ RIII, CD23) auf B-Zellen (Noelle et al. 1984; Kikutani et al. 1986). Im Gegensatz hierzu konnten Kuhn et al. im Modell der IL-4-KO-Maus zeigen, dass in Abwesenheit von IL-4 die Reifung von B- und T-Zellen ohne Einschränkungen verläuft (Kuhn et al. 1991)

Interleukin-4 hat eine enge Verwandtschaft mit drei T-Zell-Zytokinen: IL-5, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating

factor GM-CSF) und IL-3. Die für diese Zytokine kodierende Genregion liegt in einem Bereich von 1000 kb und die zugehörigen Rezeptoren gehören alle der Familie der Hämatoopoetin-Rezeptoren an (Boulay, Paul 1992).

Die Hinzugabe von IL-4 und LPS zu einer Kultur ruhender B-Zellen führt zu einem Isotypenwechsel der Immunglobuline zugunsten von IgG1 und IgE (Snapper 1988).

IL-4 und IFN- $\gamma$  zeigen bei der Beeinflussung des Isotypenwechsels eine gegenseitige Hemmung. So kann durch IFN- $\gamma$  die IL-4-induzierte Bildung von IgG1 und IgE unterdrückt werden und umgekehrt durch IL-4 die IFN- $\gamma$ - und LPS-getriggerte Produktion von IgG2a gehemmt werden (Snapper und Paul 1987). In IL-4-Knockout-Mäusen sind die IgG1-Spiegel auf 1/6 reduziert, wohingegen IgM, IgG2b, IgG2a und IgA normal waren. Nach Immunisierung mit Hühner-Immunglobulin konnte gezeigt werden, dass der antigenspezifische Gesamt-Immunglobulinspiegel bei Knockout-Mäusen und der Kontrollgruppe gleich war, aber die Knockout-Maus nur 25-50% der IgG1-Spiegel und 10-20fach höhere IgG2a- und IgG2b-Spiegel erreichte. Das antigenspezifische IgG3 war annähernd dreimal höher als in der Kontrollgruppe (Kuhn et al. 1991).

IL-4 wird von T-Helfer 2 (TH2)-Zellen produziert und dient hier unter anderem als autokriner Wachstumsfaktor (Fernandez-Botran et al. 1988). TH2-Zellen produzieren neben IL-4 auch IL-5, IL-6, IL-3, GM-CSF und IL-10 (Mosmann et al. 1986,1989; Fiorentino et al. 1989).

Durch Kopf et al. wurde gezeigt, dass CD4<sup>+</sup>Zellen von IL-4-Knockout-Mäusen nach Stimulation durch Anti-CD3 kein IL-4, IL-5 oder IL-10 produzierten. IL-3, das auch von TH1-Zellen produziert wird, war um ca. 70% reduziert. Die IFN- $\gamma$ -Spiegel waren vergleichbar. Durch Hinzugabe von IL-4 vor der Stimulation der CD4<sup>+</sup>Zelle konnte der Effekt ausgeglichen werden. Nach Infektion der IL-4-Knockout-Mäuse durch einen Nematoden wurde auch in vivo eine IL-4-Abhängigkeit der TH2-Reaktion nachgewiesen, wobei im Vergleich zum Wildtyp deutlich höhere IFN- $\gamma$ -Spiegel messbar waren (Kopf et al. 1993,1995). Das Fehlen von IL-4 ist nicht gleichzusetzen mit einer fehlenden TH2-Reaktion, da auch Mastzellen und eosinophile Granulozyten TH2-typische Zytokine produzieren können.

Unreife zytotoxische T-Zellen (CTL) werden durch IL-4 zur Proliferation stimuliert und die Differenzierung zu aktiven CTL gesteigert (Trenn et al. 1988).

### 2.5.2 IL-4 und Arthritis

Bei immunologischen Reaktionen wird über die TH1-Zelle durch IFN- $\gamma$ , IL-2 und andere Zytokine die zelluläre Immunität gesteuert (zytotoxische- und DTH-Reaktion). Demgegenüber steht die TH2-Reaktion mit ihren charakteristischen Zytokinen IL-4, IL-5, IL-13, die primär über IgE und Eosinophilie die humorale Immunität vermittelt. Mit der TH1-Zelle und ihren Produkten ist sie in einem System wechselseitiger Hemmung verbunden (Abbas et al. 1996; Miossec et al. 1997). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die TH1-Reaktion für die Induktion, die Persistenz und die Gewebsschäden bei Autoimmunerkrankungen als kausal anzusehen ist, die TH2-Reaktion dagegen für allergische Erkrankungen (Mosmann, Sad 1996; Taams et al. 2001; Weiner 2001).

Bei Untersuchungen von Synovialgewebe, -flüssigkeit und Serum von RA-Patienten konnte eine deutliche Prädominanz der TH1-Reaktion und das Fehlen einer TH2-Antwort gesehen werden, was zu einer aggressiv und destruierend verlaufenden RA führte (Dolhain et al. 1996).

Für den Verlauf der RA ist die Verschiebung des TH1/TH2 Gleichgewichtes zugunsten der TH1-Zellen von Bedeutung, da hierdurch die Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen, die B-Zell-Aktivierung über Zell-Zell-Kontakt und die Produktion proinflammatorischer Zytokine verstärkt wird.

IL-4 ist das charakteristische Produkt von TH2-Zellen und hat sowohl inhibitorische als auch stimulierende Wirkung. Bei In-vitro-Studien wurde nachgewiesen, dass durch IL-4 die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  und von IgM und IgG in humanem Synovialgewebe unterdrückt werden kann. Darüber hinaus kann IL-4 die Produktion des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) im Synovium aktivieren. Durch Stimulation von MHC II und kostimulierender Moleküle auf Monozyten und Makrophagen kann über IL-4 die T-Zell-Reaktivität erhöht werden und naive und Memory-CD4<sup>+</sup> Zellen können sich zu TH2-Zellen umwandeln (van Roon et al. 1995, 1996, 2001; Montaner et al. 1999; Skapenko et al. 1999). Die Ausbildung der Rezeptoren Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RIII auf Makrophagen, die an der Antigenaufnahme und Immunkomplex-Antwort im RA-Gelenk beteiligt sind, wird dagegen durch IL-4 unterdrückt (Kimberly et al. 1995; Isomäki et al. 1996).

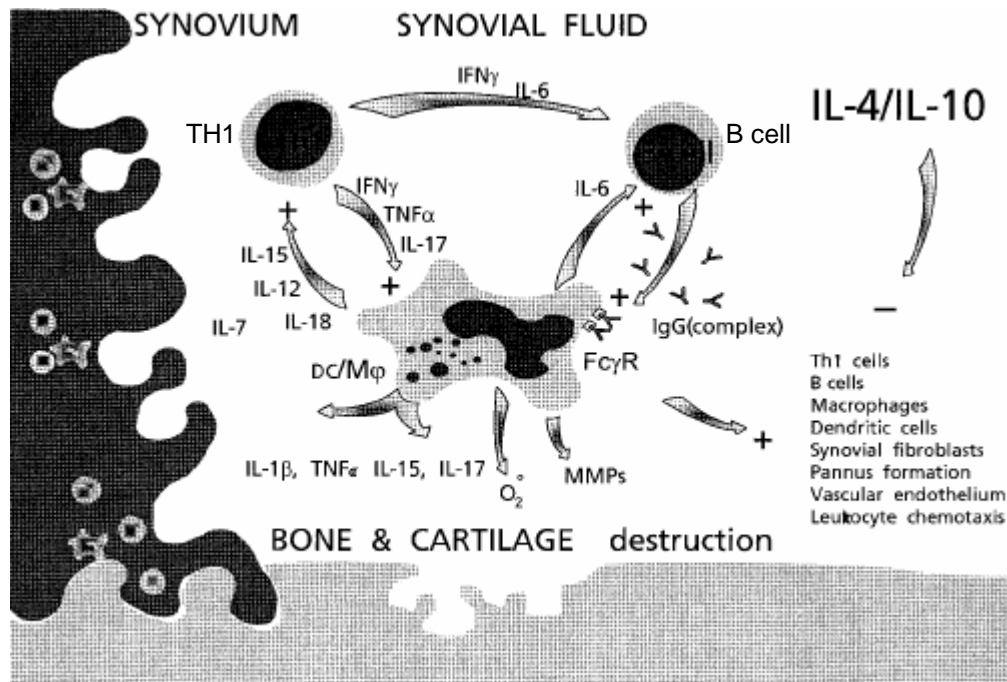


Abb.2 Rolle von Makrophagen (Mφ), dendritischen Zellen (DC), TH1-Zellen (TH1) und B-Zellen (B) mit ihren Produkten bei der Induktion der RA und dem synergistischen Antagonismus durch IL-4 und IL-10 (Quelle: van Roon et al. 2001)

Ein pathogenetisches Merkmal der chronischen Entzündung und des Tumorwachstums ist die Veränderung der Angiogenese durch den Gefäß-Endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor (VEGF). Der Einfluss von IL-4 auf die VEGF-Bildung der synovialen Fibroblasten wurde von Hong et al. untersucht. Hierzu wurden die Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten aus rheumatischen Gelenken herauspräpariert und mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-4, mit und ohne TGF- $\beta$  (Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 /Transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) inkubiert. Die alleinige Inkubation mit IL-4 führte zu einer dosisabhängigen vermehrten Bildung von VEGF, wohingegen dieser Effekt sich zu einer VEGF-Hemmung umkehrte, wenn die Synoviozyten vorher mit TGF- $\beta$  stimuliert wurden. Eine Kombination aus IL-4 und IL-10 unterdrückte die TGF- $\beta$ -induzierte VEGF-Produktion noch effektiver. IL-4 konnte auch die TGF- $\beta$ -induzierte Bildung der Cyclooxygenase-2-mRNA hemmen und hierdurch eine entzündungshemmende Wirkung entfalten. Aus dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass IL-4 bei bestehender Entzündung die pathologische Angiogenese durch VEGF inhibieren kann (Hong et al. 2007).

Tarner et al. zeigten im Modell der CIA, dass nach Transfer antigenspezifischer T-Zell-Hybridome, die durch Retroviren zur Produktion von IL-4 geführt wurden, die Anzahl der

entzündeten Gelenke signifikant reduziert werden konnte. Dieser Effekt war nur bei einem Transfer vor dem klinischen Ausbruch der CIA zu erreichen (Tanner et al. 2002).

In der Proteoglycan-induzierten Arthritis in BALB/c-Mäusen konnte durch IL-4-Gabe die TH1/TH2-Balance zu TH2 verschoben und die TH1-Antwort mit der IL-1- und IL-6-Produktion im Gelenk signifikant reduziert werden. Die IL-4-Therapie war in diesem Modell auch in der akuten Entzündungsphase effektiv (Finnegan et al. 1999).

Ein ähnlicher Effekt wurde von Horsfall et al. bei der CIA in DBA/1-Mäusen beschrieben (Horsfall et al. 1997).

Um den Einfluss von IL-4 auf den Verlauf der Proteoglycan-induzierten Arthritis genauer zu beschreiben, wurde durch Cao et al. in BALB/c-Mäusen gezielt der IL-4-Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch einen Knockout eliminiert. Der Verlauf der Arthritis war in der Knockout-Maus deutlich schwerer und bei der Exazerbation waren deutlich höhere Spiegel an Zytokinen (IL-1 $\beta$ /IL-6) und Chemokinen (Makrophagen-inflammatorisches Protein (MIP) 1 $\alpha$  und 2) zu messen. Interessanterweise kam es in dieser Studie nicht zu einer verstärkten Bildung von IFN- $\gamma$  durch TH1-Zellen und zu keiner Verschiebung in den Subklassen der Proteoglycan-spezifischen Antikörper hin zu einer IgG2a-Antwort. Hieraus kann geschlossen werden, dass IL-4 im Modell der Proteoglycan-induzierten Arthritis unabhängig von IFN- $\gamma$  und der T-Zell-Aktivität auch auf Ebene der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten die Schwere der Arthritis beeinflusst (Cao et al. 2007). Desweiteren ist die Verschlechterung der Proteoglycan-induzierten Arthritis nach Knockout des IL-4-Rezeptors möglicherweise Ausdruck einer gesteigerten IL-17-Bildung wegen fehlender Suppression durch IL-4. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen von Sarkar et al. (2007) unterstützt, die bei der CIA einen mildereren Verlauf nach genetisch induzierter IL-4-Produktion von dendritischen Zellen beschrieben haben.

Im Widerspruch hierzu konnte in Therapieversuchen am Menschen mit IL-4, um die Balance zugunsten der TH2-Antwort zu beeinflussen, kein positiver Effekt nachgewiesen werden (van Bosch et al. 1998). Auch in einer anderen Studie war bei der CIA in DBA/1-Mäusen durch IL-4-Injektion kein therapeutischer Nutzen zu verzeichnen (Joosten et al. 1997). Die Ursache für dieses Therapieversagen ist wahrscheinlich in den unterschiedlichen Dosierungen und Applikationsformen des IL-4 zu suchen, da in den erfolgreichen Studien 20-30fach höhere IL-4-Dosen verabreicht wurden.

Durch Oncostatin M (OSM) wird über eine Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Aggrecanasen bei der RA der Knorpelabbau vorangetrieben. TGF- $\beta$ 1 fördert die

Knorpelreparatur, kann aber in großen Mengen die Entzündung verstärken. OSM und TGF- $\beta$ 1 induzieren den Gewebe-Inhibitor der Metalloproteinase-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3 TIMP-3), der ein natürlicher Inhibitor der MMPs, der Aggrecanasen und des TNF- $\alpha$ -konvertierenden Enzymes ist (TACE).

Durch IL-4 wird im Chondrozyten die OSM-induzierte Produktion von MMP-13 und TIMP-3 stark und die Produktion der Aggrecanasen gering unterdrückt. Hieraus folgt eine ambivalente Rolle des IL-4, da es über die Hemmung der MMPs und Aggrecanasen einerseits protektiv wirkt, diese Protektion aber auf der anderen Seite durch die TIMP-3-Hemmung relativiert wird (El Mabrouk et al. 2007).

Bei der IL-4-defizienten C57BL/10-Maus konnte im Modell der CIA eine Abhängigkeit vom Immunisierungsschema festgestellt werden. Nach Immunisierung mit Mycobakterien supplementiertem Freund'schen Adjuvans (CFA) war zwischen Knockout-Mäusen und der Kontrollgruppe kein Unterschied im Verlauf und den immunologischen Parametern feststellbar. Als Ursache hierfür wird die Verschiebung der Balance zugunsten von TH1 durch CFA gesehen. Nach Immunisierung ohne Mycobakterien zeigten die Knockout-Mäuse eine geringere Inzidenz der Arthritis und eine mildere akute Entzündung, aber einen protrahierten chronischen Verlauf mit Gelenkdestruktionen. Die Spiegel der antigenspezifischen Antikörper lagen in der Knockout-Gruppe dabei deutlich unter denen der Kontrollgruppe (Svensson et al. 2002).

## 2.6 Fragestellung

Die RA ist eine entzündliche Systemerkrankung, deren Ursache trotz langjähriger Forschung bisher nicht gefunden werden konnte. Zusammenhänge mit dem genetischen Hintergrund der Erkrankten sind mehrfach nachwiesen worden, aber je nach Rassenzugehörigkeit heterogen.

Die RA zeigt ein akutes Entzündungsbild, an dessen Ausprägung unter anderem TH1-Zellen mit ihren Produkten und Reaktionspartnern beteiligt sind. TH1- und TH2-Zellen stehen sich in einem System der gegenseitigen hemmenden Beeinflussung gegenüber und bei der RA kann eine Dominanz der TH1-Reaktion nachgewiesen werden. Viele Therapieversuche mit z.T. inkongruenten Ergebnissen wurden in den letzten Jahren unternommen, um diese Dysbalance zugunsten von TH2 zu verschieben.

Mit der AIA steht ein Tiermodell zur Verfügung, mit dem der Ablauf, das histologische Bild und die Therapiemöglichkeiten im Experiment unter kontrollierten Bedingungen gut nachvollzogen werden. Die IL-4-Knockout-Maus gibt darüber hinaus die Möglichkeit, die

AIA im Immunsystem eines Individuums zu beschreiben, das von Geburt an eine Schwächung des TH2-Systems hat. Durch den angeborenen Defekt wird die Abhängigkeit von Dosierungen und Applikationsformen depletierender Antikörper, wie bei der Wildtyp-Maus, aufgehoben.

### **Fragestellung**

1. Wie verändert das Fehlen von IL-4 den klinischen Verlauf der AIA?  
Gibt es Unterschiede in der akuten oder chronischen Phase der Entzündung?  
Kann anhand der DTH-Reaktion bei fehlender Hemmung durch IL-4 eine verstärkte zelluläre Immunität nachgewiesen werden?
2. Unterscheidet sich das histologische Bild in den Phasen der Entzündung?
3. Bestehen Unterschiede in Konzentration und Subklassen unspezifischer und antigenspezifischer Antikörper?
4. Kann bei fehlendem IL-4 auf Zytokinebene eine Prädominanz der TH1-Zytokine nachgewiesen werden, oder kommt es zu einer Hochregulation anderer TH2-Zytokine?

Aus den Ergebnissen werden neue Erkenntnisse über die Rolle von IL-4 in der Pathogenese der akuten und chronischen Arthritis erwartet.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Versuchstiere

Für die Erhebung klinischer Daten und zur Charakterisierung der T-Zell-Funktion wurden in 5 Zeitstudien folgende Tierstämme verwendet:

C57BL/6 : 8-12 Wochen alte ♂+♀ (89 Tiere)

IL-4-knockout (C57BL/6) : 8-12 Wochen alte ♂+♀ (133 Tiere) (Kanagawa et al. 1993)

Alle Tiere stammten vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden; Fütterung mit Altromin-Pellets # 1326, Wasser ad libitum).

Alle Manipulationen der Versuchstiere wurden nur durch dafür qualifizierte Personen durchgeführt. Alle Tierversuche waren vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (AZ 02-17/00 vom 18.05.2000).

##### 3.1.2 Geräte

Begasungsbrutschrank Cellstar; *NUNC*, Wiesbaden

ELISA-Reader EAR 400 FT; *SLT LABORINSTRUMENTS DEUTSCHLAND*, Crailsheim

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Tiefe 0,2 mm); *FEINOPTIK*, Bad Blankenburg

Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen; *EPPENDORF*, Hamburg

Kühlzentrifuge Jouan CR312; *JOUAN*, Unterhaching

Laminarflowbox; *ELEKTROMAT*, Dresden

Mehrkanalpipetten; *EPPENDORF*, Hamburg

Mikroskop Jenamed; *CARL ZEISS*, Jena

Multipipette; *EPPENDORF*, Hamburg

Oditest-Schnelltaster; *KRÖPLIN*, Schlüchtern

Pipettierhilfe; *HIRSCHMANN LABORGERÄTE*; Eberstadt

Präparationsbesteck; *AESKULAP*, Tuttlingen

Tischzentrifuge 30F, *HETTICH*, Tuttlingen

Tischzentrifuge Biofuge 13; *HERAEUS*, Hanau

Vortexgerät VF2; *IKA-LABORTECHNIK*, Staufen i. Br.

Waschgerät Columbus; *SLT LABORINSTRUMENTS*, Crailsheim

### 3.1.3 Materialien

Einmalfilter (0,45 µm); *SCHLEICHER & SCHÜLL*, Dassel  
Einmalspitzen (10, 100 und 1000 µl); *EPPENDORF*, Hamburg  
Einmalspritzen und -kanülen; *BRAUN-MELSUNGEN*, Melsungen  
Einmalstangenpipetten in verschiedenen Größen; *GREINER*, Nürtingen  
Eppendorftubes; *EPPENDORF*, Hamburg  
FACS-Röhrchen; *FALCON*, Gräfelfing-Locharn  
Gewebekulturplatten 24 Well; *GREINER*, Nürtingen  
Gewebekulturschalen (60/15 mm); *GREINER*, Nürtingen  
Gewebekulturschalen (100/20 mm); *CORNING COSTAR*, Bodenheim  
Mikrotiterplatten für Zytokin-ELISA (Maxisorb); *NUNC*, Wiesbaden  
Mikrotiterplatten für Immunglobulin-ELISA, hochbindend, F-Form, *GREINER*, Nürtingen  
Objektträger und Deckgläser; *MENZEL*, Braunschweig  
Petrischalen, 100/20 mm, steril, unbehandelt, *GREINER*, Nürtingen  
Polystyrol- (PS-) Röhrchen (14 ml); *GREINER*, Nürtingen  
Polypropylen- (PP-) Röhrchen (50 ml); *GREINER*, Nürtingen  
TopSeal Abdeckfolie; *PERKIN-ELMER*, Rodgau-Jügesheim  
Zellsiebe; *FALCON*, Gräfelfing-Locharn

### 3.1.4 Chemikalien

AlCl<sub>3</sub>; *SIGMA*, Deisenhofen  
Bordetella pertussis (hitzeinaktiviert); *CHIRON BEHRING*, Marburg  
BSA (Bovines Serum Albumin); *SIGMA*, Deisenhofen  
Concanavalin A (Con A); *AMERSHAM*, Freiburg  
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); *SIGMA*, Deisenhofen  
Eosin; *MERCK*, Darmstadt  
Ether zur Narkose; *HOECHST*, Frankfurt/M.  
Fetales Kälberserum (FCS); *GIBCO*, Karlsruhe  
Glutamin; *GIBCO*, Karlsruhe  
Hämatoxylin; *MERCK*, Darmstadt  
HCl; *ROTH*, Karlsruhe  
HCOOH; *SIGMA*, Deisenhofen  
Heparin (Liquemin N20000); *ROCHE*, Grenzach-Wyhlen

Hepes; *GIBCO*, Karlsruhe

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *ROTH*, Karlsruhe

Komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA); *SIGMA*, Deisenhofen

2-Mercaptoethanol; *GIBCO*, Karlsruhe

Methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA); *SIGMA*, Deisenhofen

Mycobacterium tuberculosis (Klon H37 RA); *BECTON DICKINSON*, Heidelberg

Natriumpyruvat; *GIBCO*, Karlsruhe

NH<sub>4</sub>Cl; *SIGMA*, Deisenhofen

N-(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid; C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>.2HCl.CH<sub>3</sub>OH; *FLUKA*, Buchs

Ortho-Phenylendiamin (OPD); *SIGMA*, Deisenhofen

Penicillin/Streptomycin/Glutamin; *GIBCO*, Karlsruhe

p-Nitrophenylphosphat (pNPP) *SERVA*, Heidelberg

RPMI 1640 Medium; *GIBCO*, Karlsruhe

Streptavidin-Peroxidase (SA/PO); *DIANOVA*, Hamburg

Trinatriumzitat, *SIGMA*; Deisenhofen

TRIS; *SIGMA*; Deisenhofen

Trypanblau; *SIGMA*, Deisenhofen

Tween 20; *SIGMA*; Deisenhofen

Zitronensäure; *SIGMA*, Deisenhofen

### 3.1.5 Antikörper

**Tab.1** Antikörper zur Zytokinbestimmung:

	<b>Capture (C), Standard (S) und Detektor (D)</b>	<b>Klon</b>	<b>Konzentration</b>
C	rat-anti-mouse IL-2	JES6-1A12	0,5 mg/ml
S	rec.murine IL-2 (TEBU)		2 ng/ml
D	rat-anti-mouse IL-2 Biotin	JES6-5H4	0,5 mg/ml
C	rat-anti-mouse IL-4	BVD4-1D11	0,5 mg/ml
S	rec.murine IL-4 (TEBU)		0,2 ng/ml
D	rat-anti-mouse IL-4 Biotin	BVD6-24G2	0,5 mg/ml
C	rat-anti-mouse IL-5	TRFK5	0,5 mg/ml
S	rec. Murine IL-5		5 ng/ml
D	rat-anti-mouse IL-5 Biotin	TRFK4	0,5 mg/ml
C	rat-anti-mouse IL-6	MP5-20F3	0,5 mg/ml
S	rec.murine IL-6		10 ng/ml
D	rat-anti-mouse IL-6 Biotin	MP5-32C11	0,5 mg/ml

C	anti-mouse IL-10		
S	rec.murine IL-10		2 ng/ml
D	anti-mouse IL-10 Biotin		
C	rat-anti-mouse IFN- $\gamma$	R4-6A2	1 mg/ml
S	rec.murine IFN- $\gamma$ (GIBCO)		3 ng/ml
D	Rat-anti-mouse IFN- $\gamma$ Biotin	XMG1.2	0,5 mg/ml

Capture- und Detektorantikörper zum Nachweis von IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IFN- $\gamma$ : PHARMINGEN, San Diego, USA; für den Nachweis von IL-10 wurde ein BD OptEIA™ Set mit dazugehörigem Protokoll verwendet

**Tab.2** Antikörper zur Antikörperbestimmung

	<b>Capture (C), Standard (S) und Detektor (D)</b>	<b>Konzentration</b>
C	Anti-IgG1	(1mg/ml)
S	mIgG1	
D	Anti-IgG1-AP (1 $\mu$ g/ml)	(1mg/ml)
C	mBSA	(8 $\mu$ g/ml)
S	1 $\mu$ l StdS/ ml = 1 i.E	
D	Anti- IgG2a <sup>b(igh-1b)</sup> -Biotin	(0,5mg/ml)
C	Anti-IgG2b	(1mg/ml)
S	mIgG2b	
D	Anti-IgG2b-AP	(1mg/ml)
C	Anti-IgG3	(1 $\mu$ g/ml)
S	mIgG3	
D	Anti-IgG3-AP	(1mg/ml)
C	Anti-IgM	(1mg/ml)
S	mIgM	
D	Anti-IgM-AP	(1mg/ml)

Alle Anti-Ig Antikörper außer Anti-IgG2a<sup>b(igh-1b)</sup>: Ziege Anti-Maus, Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, Alabama, USA; Anti-IgG2a<sup>b(igh-1b)</sup>-Biotin, PHARMINGEN, San Diego, USA; alle Maus Ig-Standard, Sigma. Das Standardserum (StdS) für die Bestimmung der mBSA-spezifischen Ig wurde aus verschiedenen Seren von arthritischen Mäusen (AIA) hergestellt.

### 3.1.6 Kulturmedien und Puffer

Komplettes Medium:

RPMI 1640 supplementiert mit:

FCS 10 %

Glutamin 2 mM

Hepes 10 mM

Penicillin-G 100 U/ml

Streptomycin 0,1 mg/ml

2-Mercaptoethanol 0,05 mM

Natriumpyruvat 1 mM

PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung):

8 g NaCl

1,44 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,2 g KCl

in 1 l Aqua dest. lösen und auf pH 7,4 einstellen

Ammoniumchlorid/TRIS zur Erythrozyten-Lyse:

1. 0,83% (w/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (7,47g in 900ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

2. TRIS (2,059g in 100ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) auf pH 7,65

9 Teile von 1. + 1 Teil von 2. mischen, auf pH 7,2 einstellen

Beladungspuffer für Zytokin-ELISA:

Natriumcarbonatpuffer; pH 9,5 (NaCa 9,5)

0,84 g  $\text{NaHCO}_3$  in 100 ml Aqua dest. lösen

Natriumphosphatpuffer; pH 6,5 (NaPh 6,5)

1,48 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  + 1,85 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 100 ml Aqua dest. lösen

Natriumphosphatpuffer; pH 9,0 (NaPh 9,0)

1,38g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 100 ml Aqua dest. lösen

Waschpuffer für Zytokin-ELISA:

0,05 % Tween 20 gelöst in PBS

Zitratpuffer (pH 4,8) (Substratpuffer für Peroxidase):

2,1 g Zitronensäure

16,2 ml 1 N NaOH

in 84 ml Aqua dest. lösen

Substratlösung für die Peroxidase:

2 mg/ml ortho-Phenylendiamin (OPD) gelöst in Natriumzitratpuffer (0,1 M), pH 4,8 und  
filtriert; vor dem Auftragen Zugabe von 25 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %)

Stopplösung für die Peroxidase:

2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Substratlösung für die alkalische Phosphatase:

2,6 mg/ml para-Nitrophenylphosphat (pNPP) wurden in Substratpuffer (Stammlösung TRIS  
und Aqua dest. 1:1 (V/V) gemischt und 0,2 mg/ml MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O) gelöst.

Stopplösung für die alkalische Phosphatase:

5,3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 100 ml Aqua dest. lösen.

### **Lösungen für Histologie**

Entkalkungslösung

25%ige HCL

100%ige HCOOH

70 g AlCl<sub>3</sub>

auf 1 l Aqua bidest.

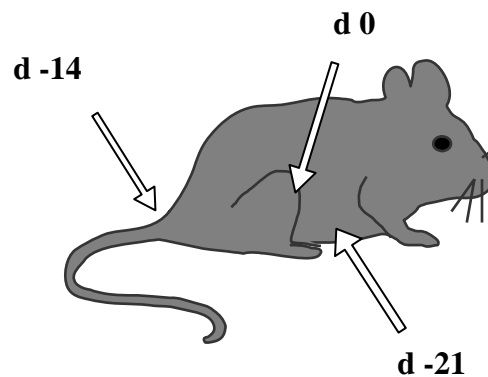
### 3.2. Methoden

#### 3.2.1 Immunisierung und Arthritisinduktion

Zur Immunisierung der Mäuse wurde komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA) verwendet, welches mit *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; DIFCO) supplementiert wurde, um eine Endkonzentration von 2mg/ml zu erreichen. Das supplementierte CFA wurde mit einem gleichen Volumen in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und danach steril filtriertem mBSA (2mg/ml) zum Immunisierungsadjuvans (CFA-mBSA) emulgiert.

Die Immunisierung erfolgte nach einem strengen Zeitregime. Die erste Immunisierung erfolgte 21 Tage vor Induktion der Arthritis (Tag -21) durch eine subkutane Injektion von 100µl CFA-mBSA in die rechte Flanke. Bei der zweiten Immunisierung, der Booster-Immunisierung 14 Tage vor Arthritisinduktion (Tag -14), wurde das CFA-mBSA in die Schwanzbasis appliziert (Abb.3). Zusätzlich wurden den Mäusen zur Unterstützung der Immunantwort (Ryan et al.,1998) an beiden Zeitstufen  $5 \times 10^8$  hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis* Keime in 50µl intraperitoneal injiziert.

Am Tag 0 wurde die Arthritis durch eine intraartikuläre Injektion von 100µg mBSA in 25µl physiologischer Kochsalzlösung in das rechte Kniegelenk ausgelöst. Die Injektion erfolgte unter Ethernarkose. Die Antigenlösung wurde vor der Injektion sterilfiltriert.



**Abb. 3** Immunisierungsschema der AIA

#### 3.2.2 Erhebung der klinischen Daten

##### 3.2.2.1 Gelenkschwellung und Gewicht

Nach Induktion der Arthritis kam es zu einer deutlichen entzündlichen Schwellung des rechten Kniegelenkes, welche mittels Oditest-Schnelltaster zu festen Zeitstufen gemessen wurde (d0, d1, d3, d5, d8, d10, d14, d17, d21), um den klinischen Verlauf zu dokumentieren. Als Referenz wurde zu den jeweiligen Zeitstufen das kontralaterale, unbehandelte Gelenk

mitgemessen und die Differenz ( $\mu\text{m}$ ) zwischen rechtem und linkem Kniegelenk zur Beurteilung der Schwellung herangezogen.

Zu gleichen Zeitstufen wurde das Gewicht ermittelt, um eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen zu erfassen.

#### 3.2.2.2 Beurteilung der verzögerten Überempfindlichkeit (DTH)

Um die verzögerte Überempfindlichkeits-Reaktion auszulösen, wurde den Mäusen nach beidseitiger Messung der Ohrdicken (0h) in das rechte Ohr subdermal  $10\mu\text{l}$  in NaCl gelöstes mBSA ( $0,5\text{mg/ml}$ ) injiziert. Die Ohrdicke wurde vor der Injektion, nach 24 Stunden und nach 48 Stunden mittels Oditest-Schnelltaster gemessen und die Schwellung aus der Differenz zwischen Stunde 0, Stunde 24 und Stunde 48 ermittelt

#### 3.2.3 Histologie

Zu den jeweiligen untersuchten Zeitstufen (0, 3, 8 und 21 Tage) wurde den Mäusen nach der Tötung das rechte und das linke Kniegelenk entnommen, enthäutet und für 24 Stunden in gepufferter 4,5% Formalinlösung fixiert. Nach der Entkalkung für weitere 24 Stunden wurde den Gelenken durch eine aufsteigende Alkoholreihe Wasser entzogen. Anschließend wurden sie in Paraplast eingebettet, in der Frontalebene in  $3\text{-}5\mu\text{m}$  Schichtdicke geschnitten und auf einen Objektträger übertragen (Kruijsen et al. 1983). Pro Gelenk wurden mindestens drei Schnitte angefertigt. Nach Entfernung des Paraffins durch eine absteigende Alkoholreihe wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung vorgenommen (Romeis 1989).

Die Begutachtung der Histologien erfolgte durch mindestens einen unabhängigen Untersucher, ohne Wissen der Versuchsbedingungen und der Gruppeneinteilung.

Bewertungskriterien für die akute Entzündungsreaktion war die Ausprägung der Infiltration durch Granulozyten. Als Zeichen der chronischen Entzündung wurde die Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht, die Stärke der mononukleären Infiltration und der Befall periartikulärer Strukturen gewertet. Die chronisch-destruktiven Veränderungen wurden anhand der Pannusbildung und der Ausprägung der Knorpelnekrosen festgemacht. Dem Schweregrad der einzelnen Kriterien wurde zur besseren Vergleichbarkeit ein Punktwert zugeordnet (Tab. 3.).



**Tab.3** Punktesystem bei lichtmikroskopischer Beurteilung der Histologie

<b>Punkte</b>	<b>Mesothelveränderungen</b>
0,5	Geringe Abnormitäten, Schwellung, kubische Transformationen einschichtig, herdförmig
1	Herdförmige kubische Transformationen, einschichtig, an mehreren Stellen
1,5	Wie 1, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend
2	Kubische Transformationen, mehrreihig, herdförmig
2,5	Wie 2, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend, Nekrosen möglich
3	Mehrreihiges Mesothel mit ausgedehnten Nekrosen
<b>Punkte</b>	<b>Infiltration</b>
0,5	Einzelne schütterte, herdförmige Infiltrate von Granulozyten, Lymphozyten/Plasmazellen auf die Recessus beschränkt
1	Herdförmige Infiltrate an mehreren Stellen, aber beschränkt
1,5	Diffuse Infiltrate, beschränkt
2	Herdförmige Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
2,5	Diffuse Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
3	Ausgeprägte Infiltrate, auf die Kapsel übergreifend oder mit herdförmiger Aggregation
<b>Punkte</b>	<b>Pannusbildung</b>
0,5	Angedeutete Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit geringer Infiltration
1	Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit deutlicher Infiltration
1,5	Entwicklung an mehreren Stellen mit deutlicher Infiltration und zungenförmiger Auflagerung auf der Knorpeloberfläche oder zangenförmiger Infiltration an einer Stelle
2	Entwicklung an mehreren Stellen mit zangenförmiger Infiltration oder flaches Überwachsen einer Gelenkfläche
2,5	Deutlich ausgeprägte Entwicklung an mehreren Stellen mit zangenförmiger Infiltration oder zungenförmigem Überwachsen einer oder mehrerer Gelenkflächen
3	Ausbildung an mehr als vier Stellen oder exzessive Ausbildung an zwei Stellen
<b>Punkte</b>	<b>Knorpelschädigung</b>
0,5	Oberflächliche Nekrose in einer Gelenkregion, dieselbe nicht vollständig umfassend
1	Oberflächliche herdförmige Nekrose in mehr als einer Gelenkregion
1,5	Nekrosen in mehr als einer Region oder eine Region vollständig umfassend
2	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, herdförmig ausgeprägt
2,5	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, in mehr als einer Gelenkregion
3	Ausgedehnte tiefgreifende Nekrosen mindestens bis zur Tidemark an mehreren Stellen

### 3.2.4 Bestimmung der Serumimmunglobuline

An den jeweiligen Zeitstufen (0d, 3d, 8d, 21d) wurden die Mäuse unter Ethernarkose durch Aufschneiden der Karotiden entblutet und durch zervikale Dislokation getötet. Das Blut wurde in sterilen Bechergläsern aufgefangen und zur Gerinnung 2 Stunden bei 4°C gelagert. Nach Ablösen des Blutkuchens wurde das abpipettierte Serum 10 Minuten bei 5000rpm zentrifugiert und bis zur Auswertung bei -70°C eingefroren.

Die Bestimmung der Gesamtimmunglobuline mit ihren Subklassen und der mBSA-spezifischen Immunglobuline mit ihren Subklassen erfolgte mit der Sandwich-ELISA-Technik. Für alle Untersuchungen wurden hochbindende 96-Well-Mikrotiterplatten (GREINER) verwendet.

#### 3.2.4.1 Bestimmung der Gesamtimmunglobuline

Zur Bestimmung der Gesamtimmunglobuline wurden die Mikrotiterplatten mit 100µl Anti-Immunglobulin-Antikörpern pro Well (1 µg/ml in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2) beladen und über Nacht bei 4°C inkubiert (Tab.4). Die Platten wurde mit dem Waschgerät (COLUMBUS) dreimal mit Waschpuffer (PBS/Tween 0,05%) zur Entfernung überschüssiger Immunglobuline gewaschen und danach bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit 300µl 3% BSA in PBS/Tween 0,05% beschichtet, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 50µl der in 1% BSA in PBS/Tween 0,05% verdünnten Serumprobe jeweils doppelt aufgetragen. In gleicher Weise wurde der Standardantikörper in einer Verdünnungsreihe auf dieselbe Platte aufgetragen. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und danach ungebundene Immunglobuline durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Detektion erfolgte mittels eines Alkalische-Phosphatase-markierten Antikörpers, welcher in 1% BSA in PBS/Tween 0,05% verdünnt wurde (1µg/ml). Es wurden jeweils 100µl des verdünnten Detektors pro Well aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Detektorantikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt und 100µl Substratlösung (2,6 mg/ml PNPP = p-Nitrophenylphosphat in 1:1 Tris/Aqua + 0,2 mg/ml MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O) pro Well aufgetragen. Nach 15-30 min wurde der enzymatische Farbumschlag durch Zugabe von 100µl Natriumkarbonatlösung (5,3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/100ml Aqua dest.) gestoppt und anschließend die Extinktion mit einem ELISA-Reader bei 405 nm gegen eine Referenz von 690 nm gemessen.

Aus dem Doppelauftrag wurde jeweils ein Mittelwert für die Extinktion errechnet und aus den Mittelwerten der Standardkurve eine Eichgerade erstellt. Nach Umstellung der Gleichung

der Eichgerade konnten die Extinktionsmittelwerte einer Antikörperkonzentration zugeordnet werden.

**Tab.4** Auftrag ELISA Gesamtimmunglobuline

Capture/Beladung	Standard	Probe	Detektor
Anti-IgG1 (1µg/ml)	Mouse IgG1	1:100000	Anti-IgG1-AP (1µg/ml)
Anti-IgG2b (1µg/ml)	Mouse IgG2b	1:100000	Anti-IgG2b-AP (1µg/ml)
Anti-IgG3 (1µg/ml)	Mouse IgG3	1:20000	Anti-IgG3-AP (1µg/ml)
Anti-IgM (1µg/ml)	Mouse IgM	1:20000	Anti-IgM-AP (1µg/ml)

#### 3.2.4.2 Bestimmung der mBSA-spezifischen Antikörper

Um die mBSA-spezifischen Antikörper-Subklassen zu bestimmen, wurden die Mikrotiterplatten mit 100µl mBSA-Lösung (8 µg/ml in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der weitere Ablauf war, außer für Anti-IgG2a<sup>b(igh-1b)</sup>, analog 3.2.5.1. Unterschiede bestanden in der Probenverdünnung und dem Detektorauftrag (Tab.5). Als Standard wurde das Serum verschiedener arthritischer Mäuse verwendet (Standardserum= StdS). Die Extinktionswerte wurden anhand der Standardkurve imaginären Einheiten (i.E.) zugeordnet, wobei eine Verdünnung des Standardserums von 1:1000 als eine Einheit definiert wurde.

Da der Antikörper zum Nachweis von mBSA-spezifischem IgG2a an Biotin gebunden war, musste vor Auftragen des Substrates (OPD) eine Peroxidase über Streptavidin an den Antikörper gebunden werden. Hierzu wurden 100µl Streptavidin-Peroxidase (0,1µl/ml 1% BSA in PBS/Tween 0,05%) auf jedes Well aufgetragen und nach 40 Minuten ungebundene Streptavidin-Peroxidase durch dreimaliges Waschen entfernt. Als Substrat wurde Ortho-Phenylendiamin (OPD) in Zitratpuffer verwendet (2mg/ml), welchem kurz vor dem Auftrag nach Filtration 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20µl/ml) hinzugefügt wurden. Die enzymatische Reaktion wurde nach ausreichendem Farbumschlag durch Hinzupipettieren von 100µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492nm gegen eine Referenz von 620nm.

**Tab.5** Auftrag ELISA mBSA-spezifische Immunglobuline

Capture/Beladung	Standard	Probe	Detektor
mBSA (8µg/ml)	1 µl StdS/ ml = 1 i.E:	1:25000	Anti-IgG-PO (5µg/ml)
mBSA (8µg/ml)	1 µl StdS/ ml = 1 i.E:	1:10000	Anti-IgG1-AP (0,5µg/ml)
mBSA (8µg/ml)	1 µl StdS/ ml = 1 i.E:	1:50000	Anti-IgG2a <sup>b(igh-1b)</sup> -Biotin (4µg/ml)
mBSA (8µg/ml)	1 µl StdS/ ml = 1 i.E:	1: 4000	Anti-IgG2b-AP (0,5µg/ml)
mBSA (8µg/ml)	1 µl StdS/ ml = 1 i.E:	1: 5000	Anti-IgG3-AP (1µg/ml)
mBSA (8µg/ml)	1 µl StdS/ ml = 1 i.E:	1: 500	Anti-IgM-AP (1µg/ml)

### 3.2.5 Präparation der Lymphknoten- und Milz-Zellen

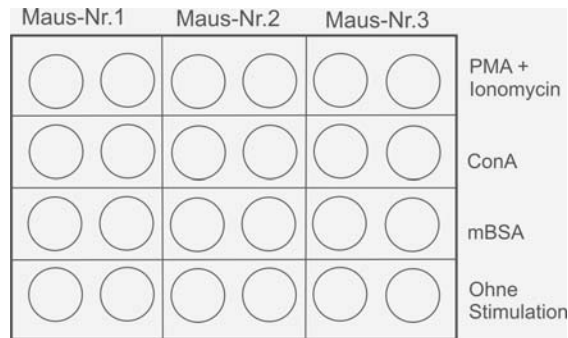
Die Mäuse wurden nach der Tötung in 70%igem Alkohol desinfiziert und unter der Laminarflowbox unter aseptischen Bedingungen weiterpräpariert. Das Peritoneum wurde durch einen medianen Bauchschnitt eröffnet, die axillären, inguinalen und abdominalen Lymphknotenstationen auf beiden Seiten aufgesucht und mit sterilen Instrumenten entfernt. Ebenso wurde den Tieren die Milz entnommen. Die Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung in RPMI 1640 gelagert.

Um die im Gewebsverband fixierten Zellen aus den Organen herauszulösen, wurden diese mit Pinzetten in RPMI 1640 in kleine Teile gezupft und die Organfragmente mit einem Spritzenstempel durch ein Metallsieb gepresst. Die isolierten Zellen wurden wieder in RPMI 1640 aufgenommen und bei 1300rpm für 8 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgegossen, das Zellpellet aufgeschüttelt und in RPMI 1640 resuspendiert.

Die Milzzellen wurden nach der Zentrifugation zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten in Ammoniumchlorid/Tris aufgenommen, durchmischt und erneut abzentrifugiert. Beide Zelltypen wurden noch zweimal mit komplettem RPMI 1640 gewaschen. Nach Zählung der vitalen Zellen in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach Trypanblaufärbung wurden die Zellen auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt.

### 3.2.6 Zellkultur

Die Lymphknoten- und Milzzellen wurde jeweils doppelt auf einer 24-Well Gewebekulturplatten (GREINER) ausgesät (Abb. 4). In einem Well waren in einem Milliliter komplettem RPMI 1640 Medium  $1 \times 10^6$  Zellen.



**Abb. 4** Auftrag T-Zellkultur und Stimulation.

Zur Stimulation der T-Zellen wurde Phorbolmyristatacetat (PMA); (5ng/Well) + Ionomycin (500ng/Well), ConA (10µg/Well) oder mBSA (25µg/Well) verwendet, zusätzlich wurde noch eine Negativkontrolle ohne Stimulation belassen.

Die Platten wurden in einem Begasungsbrutschrank (CELLSTAR, NUNC) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 42 h inkubiert. Die Überstände der einzelnen Wells wurden abpipettiert, für 10 min bei 2000rpm zentrifugiert, portioniert, um dann bei -70°C bis zur Auswertung eingefroren zu werden.

### 3.2.7 Bestimmung der Zytokine

Um die T-Zellfunktion zu erfassen, wurden verschiedene charakteristische Zytokine bestimmt, diese waren Interleukin-2, -4, -5, -6, -10 und IFN-γ. Der Zytokinnachweis erfolgte mittels der Sandwich-ELISA-Technik, wobei 96-Well-Mikrotiterplatten (MAXISORB, NUNC) verwendet wurden.

Die Platten wurden mit 50µl/Well Antizytokin-Antikörper in Beladungspuffer (Tab.6) beladen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Ungebundener Capture-Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (Waschgerät COLUMBUS) mit Waschpuffer (PBS/Tween 0,05%) entfernt. Zur Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde jedes Well bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit 300µl 3% BSA in PBS/Tween 0,05% beschichtet.

Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden jeweils 50µl der in 1% BSA in PBS/Tween 0,05% verdünnten Proben und Standards doppelt auf die Platte aufgetragen und über Nacht bei 4°C gelagert. Nach fünfmaligem Waschen wurden 100µl Detektorantikörper, verdünnt in 1% BSA in PBS/Tween 0,05% auf jedes Well aufgebracht (Tab.6) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde die Streptavidin-Peroxidase auf die Platten aufgetragen (100µl/Well; 0,1µl/ml 1% BSA in PBS/Tween 0,05%) und für 40 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach Entfernung ungebundener Streptavidin-Peroxidase wurde das Substrat aufgetragen (100µl/Well; OPD in Zitratpuffer (2mg/ml) + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und der Farbumschlag bei ausreichender Färbung durch Zugabe von 100µl 2N

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Well gestoppt. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492nm gegen eine Referenz von 620nm gemessen und nach Mittelung der doppelt aufgetragenen Werte aus der Geradengleichung die Zytokinmenge errechnet.

Variationen dieses Ablaufs gab es bei der Bestimmung der IL-10-Konzentration, da hier ein OptEia-Set von PHARMINGEN mit dazugehörigem Protokoll verwendet wurde.

**Tab.6** Auftrag Zytokin-ELISA

Capture/Beladung	Beladungs-puffer	Standard	Detektor	Substrat
rat-anti-mouse IL-2 (1000 ng/ml)	NaPh 9,0	rec.murine IL-2 (2 ng/ml)	anti-mouse IL-2 Biotin (500 ng/ml)	OPD
rat-anti-mouse IL-4 (2000 ng/ml)	NaPh 9,0	rec.murine IL-4 (0,2 ng/ml)	anti-mouse IL-4 Biotin (1000 ng/ml)	OPD
rat-anti-mouse IL-5 (2000ng/ml)	NaCa 9,5	rec. Murine IL-5 (5 ng/ml)	anti-mouse IL-5 Biotin (0,25 ng/ml)	OPD
rat-anti-mouse IL-6 (2000 ng/ml)	NaCa 9,5	rec.murine IL-6 (10 ng/ml)	anti-mouse IL-6 Biotin (0,25 ng/ml)	OPD
anti-mouse IL-10 (1 : 250 )	NaPh 6,5	rec.murine IL-10 (2 ng/ml)	anti-mouse IL-10 Biotin (1 : 250)	OPD
rat-anti-mouse IFN $\gamma$ (1000 ng/ml)	NaPh 9,0	rec.murine IFN- $\gamma$ (3 ng/ml)	anti-mouse IFN- $\gamma$ Biotin (500 ng/ml)	OPD

Beladungspuffer: Natriumphosphat pH 6,5; pH 9,0 (NaPh 6,5; NaPh 9,0)  
Natriumcarbonat pH 9,5 (NaCa 9,5)

### 3.2.8 Statistik

Die klinischen Daten als auch die im Labor ermittelten Werte stellen Einzeltierbestimmungen dar, die zur Berechnung des Mittelwertes und des Standardfehlers (SEM, Standard Error Mean) herangezogen wurden. Für die statistische Auswertung wurde das Softwareprogramm „SPSS for Windows“ eingesetzt.

Die histologischen, klinischen und immunologischen Parameter der verschiedenen Gruppen wurden mit dem nichtparametrischen U-Test von MANN und WHITNEY auf signifikante Unterschiede überprüft. Die Definition der p-Werte ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tab.7** Signifikanzen

<b>Signifikanz</b>	<b>p</b>
nicht signifikant	$p > 0,1$
begrenzt signifikant	$p > 0,05$ ((*))
signifikant	$p \leq 0,05$ (*)
sehr signifikant	$p \leq 0,01$ (**)
extrem signifikant	$p \leq 0,001$ (***)

## 4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde in 5 Zeitstudien der klinische und histologische Verlauf sowie die immunologischen Parameter der AIA bei IL-4-defizienten C57BL/6-Mäusen untersucht. Als Vergleichsgruppe wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse eingesetzt.

Drei der Studien liefen nach der Arthritisinduktion über 21 Tage mit Tierentnahmen nach 3 und 8 und 21 Tagen zur Datengewinnung. Die beiden anderen Studien wurden an Tag 3 bzw. Tag 8 nach Induktion beendet.

Die AIA wurde in ihrem klinischen Verlauf durch die Bestimmung der Gelenkschwellung und des Körpergewichtes zu festgelegten Zeitpunkten erfasst. Um die zelluläre Immunität zu bestimmen, wurde zwischen Tag 6 und 15 nach Induktion der Arthritis eine DTH-Reaktion ausgelöst. Nach Tötung der Tiere zu festgelegten Zeitstufen wurden beide Kniegelenke, die drainierenden Lymphknoten, das Blut und die Milz entnommen, um den histologischen Verlauf, die Zytokinspiegel in Lymphknoten- und Milzzellkulturen und die Immunglobulinspiegel zu bestimmen.

Bei der Darstellung der Ergebnisse in tabellarischer Form wurden zur besseren Übersicht signifikante Unterschiede fett-, geringere Spiegel der IL-4-KO-Mäuse gelb- und höhere Spiegel der IL-4-KO-Mäuse rot gekennzeichnet.

### 4.1 Gelenkschwellung und Gewicht

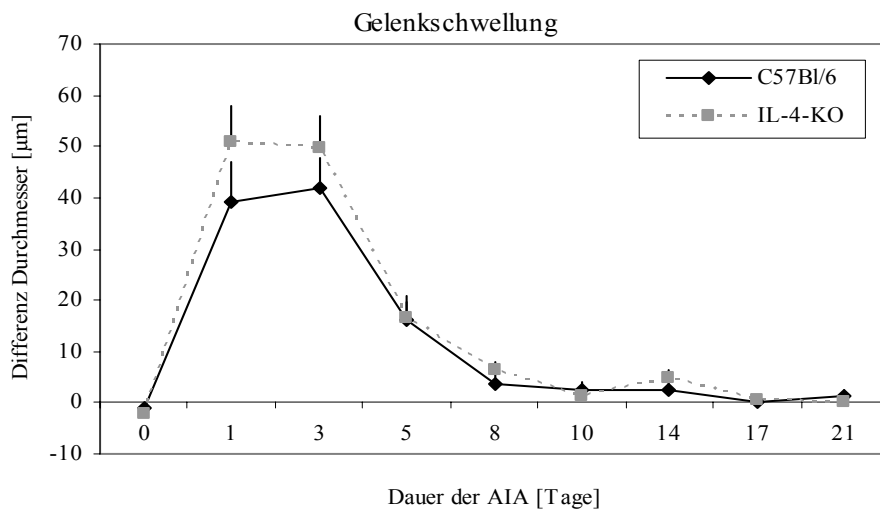
Nach Induktion der Arthritis im rechten Kniegelenk am Tag 0 wurde in festgelegten Abständen der Kniedurchmesser an beiden Knien bestimmt und die Zunahme der Gelenkschwellung anhand der Differenz zwischen dem rechten und linken Knie bzw. anhand der Differenz der Gelenkschwellung zum Ausgangswert am Tag 0 bestimmt.

IL-4-KO- und C57BL/6-Mäuse reagierten nach intraartikulärer Injektion mit einer deutlichen Schwellung des rechten Kniegelenkes mit einem Maximum zwischen Tag 1 und Tag 3. Der Durchmesser des rechten Kniegelenkes erlangte bis zum Tag 21 wieder fast das Ausgangsniveau.

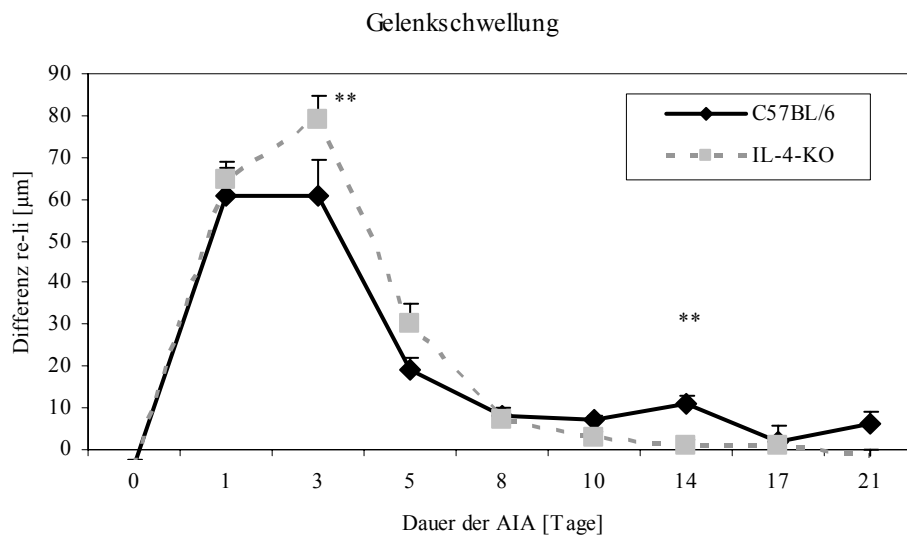
In den meisten Studien bestanden zwischen den beiden Gruppen zu keiner Zeitstufe signifikante Unterschiede (Abb.5). Nur in einer Studie konnte am Tag drei eine signifikant höhere Gelenkschwellung bei den IL-4-KO-Mäusen gesehen werden, die bis zum Tag 14 bis unter das Niveau der WT rückläufig war (Abb.6) und mit einer deutlichen TH1-Polarisierung



der Immunparameter vergesellschaftet war. Eine Übersicht der Differenzen der Gelenkschwellung aller Studien zeigt Tab. 8.



**Abb. 5** Verlauf der Gelenkschwellungen über 21 Tage.  
Exemplarischer Verlauf an Studie 2004/22 mit 22 IL-4-KO-Mäusen (IL-4-KO) und 12 C57BL/6 Wildtyp-Mäusen. Tendenzielle Unterschiede waren nicht signifikant.



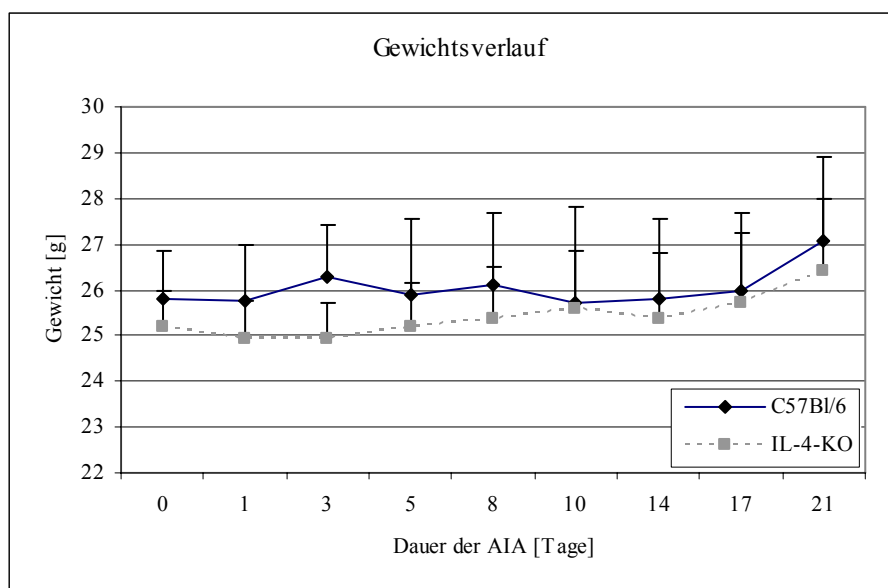
**Abb. 6** Nachweis von signifikanten Unterschieden an Tag 3 und 14 (in Studie 2003/6), die in anderen Studien z.T. aber auch entgegengesetzt nachweisbar waren. (IL-4-KO: n=33; Wildtyp: n=18) ( \*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT)

**Tab. 8** Zusammenfassung der Daten der Gelenkschwellung

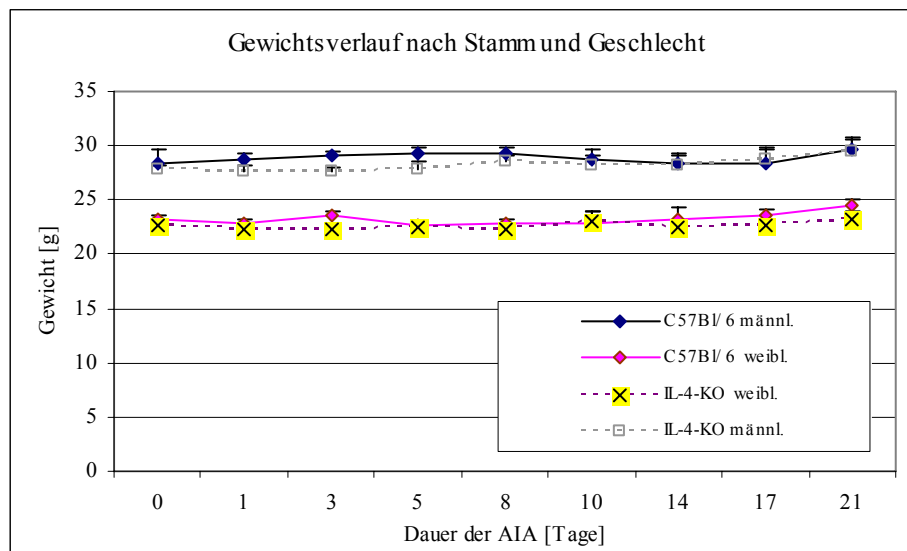
Studie	Stamm	Anzahl Tiere zu Beginn	Tage AIA							
			1	3	5	8	10	14	17	21
2000/11	C57Bl/6	9	39,4	81,7		11,7	13,3	1,7	-3,3	3,3
	IL-4 KO	18	25,6	56,9		-10,4	-6,7	-4,2	-10,8	-7,5
2002/29	C57Bl/6	11	80,0	82,0	34,0	17,0				
	IL-4 KO	11	65,9	78,2	52,7	14,5				
2003/6	C57Bl/6	18	60,7	<b>60,7</b>	19,0	8,0	7,0	<b>11,0</b>	2,0	6,0
	IL-4 KO	33	64,4	<b>79,0</b>	<b>30,3</b>	7,2	2,8	<b>1,1</b>	1,1	-1,7
2004/22	C57Bl/6	12	39,2	42,1	16,3	3,8	2,5	2,5	0,0	1,3
	IL-4 KO	22	50,9	49,5	16,7	6,3	1,3	5,0	0,6	0,0
2004/26	C57Bl/6	15	61,3	63,8						
	IL-4 KO	14	51,7	35,8						

Mittelwerte der Differenz der Gelenkschwellung in allen Studien. Die Werte entsprechen der Differenz zwischen dem rechten und linken Kniegelenk in  $\mu\text{m}$ . Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

In keiner Studie konnten zwischen IL-4-KO und WT signifikante Unterschiede im Körpergewicht gefunden werden (Abb.7). Nach Differenzierung nach Geschlecht und Stamm waren die Männchen beider Maustypen schwerer als die Weibchen (Abb. 8).



**Abb. 7** Gewichtsverlauf über 21 Tage anhand einer repräsentativen Studie.  
(Studie 2004/22, (IL-4-KO männlich/weiblich: n=16/6; C57BL/6 männlich/weiblich: n=6/6)  
Es waren keine Signifikanzen feststellbar.

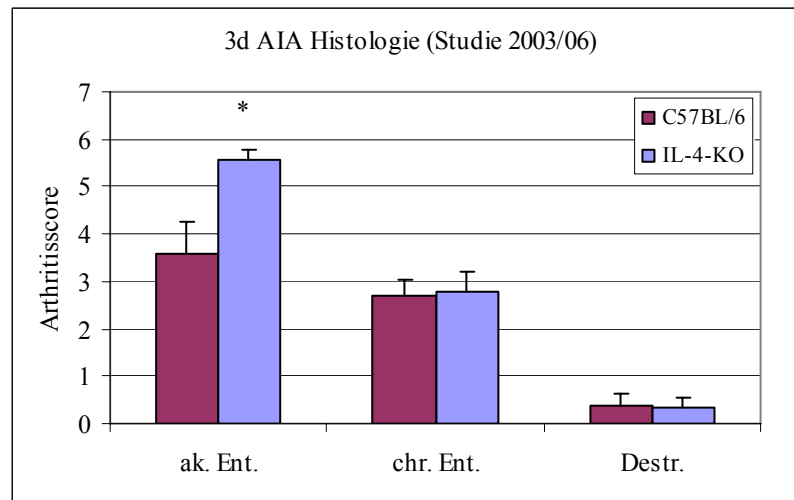


**Abb. 8** Gewichtverlauf nach Stamm und Geschlecht anhand einer repräsentativen Studie. Die Männchen beider Versuchsgruppen waren schwerer. Es waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Studie 2004/22, (IL-4-KO männlich/weiblich: n=16/6; C57BL/6 männlich/weiblich: n=6/6)

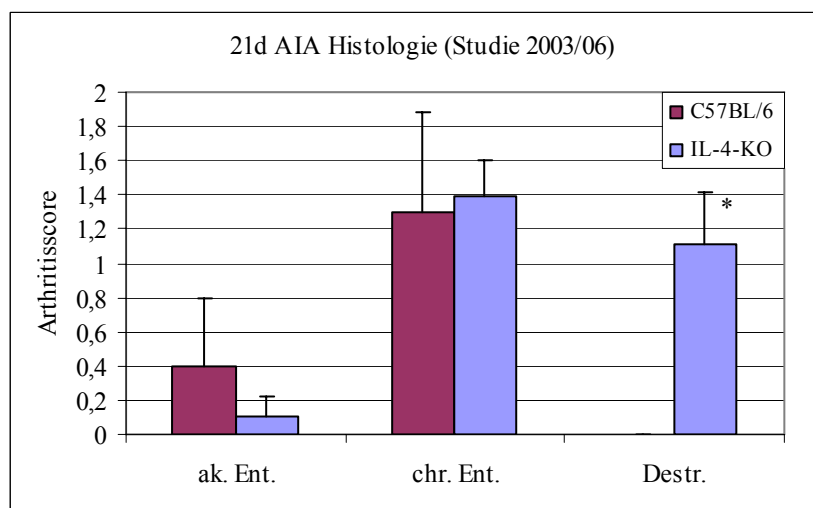
## 4.2 Histologie

Nach Tötung der Tiere und Präparation der Kniegelenke zu den festgelegten Zeitstufen wurde nach Fixierung eine histologische Aufarbeitung vorgenommen. Die Gelenkschnitte wurden durch einen unabhängigen Auswerter nach einem Scoresystem nach histologischen Zeichen der akuten und chronischen Entzündung und nach der Destruktion in einem Punktesystem bewertet.

In den meisten Studien konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Nur in der einen Studie, bei der signifikante Unterschiede der Gelenkschwellung nachweisbar waren bestätigten sich diese auch in der histologischen Auswertung. Nach 3 Tagen konnte in dieser einen Studie beim IL-4-KO histologisch eine stärkere akute Entzündungsreaktion gesehen werden (Abb.9), welche sich in der Histologie nach 21 Tagen als signifikant höhere Destruktion zeigte (Abb.10). Nach 8 Tagen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine Übersicht der histologischen Durchschnittswerte aller Studien zeigt die Tabelle 9.



**Abb. 9** Histologischer Nachweis signifikanter Unterschiede in der akuten Entzündungsphase. Daten konnten nicht reproduziert werden. (IL-4-KO: n=9; C57BL/6: n=5), (\* $p < 0,05$ , U-Test verglichen mit dem WT)



**Abb. 10** Nach 21 Tagen zeigten die IL-4 Knockout-Mäuse eine signifikant stärkere Destruktion. Die Wildtyp-Mäuse hatten keine Destruktion (Arthritis score=0). (IL-4-KO: n=9; C57BL/6: n=5) (\* $p < 0,05$ , U-Test verglichen mit dem WT)

**Tab. 9** Zusammenfassung der histologischen Scores aller Studien.

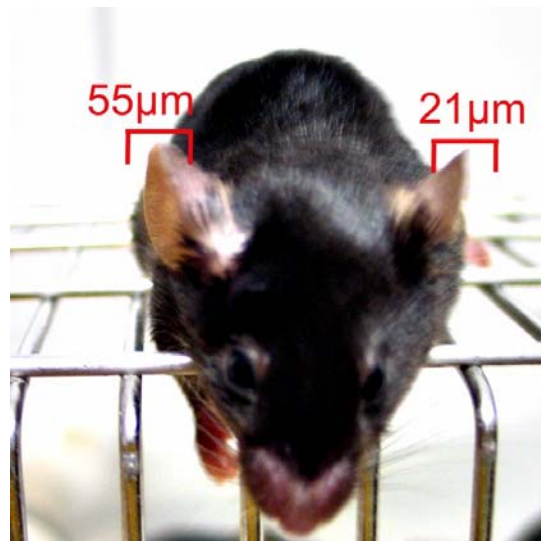
Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	Akute Entzündung	Chronische Entzündung	Destruktion
2001/02	C57Bl/6	10	0	0,0	0,3	0,1
	IL-4 Knockout	10	0	0,0	0,5	0,0
2003/6	C57Bl/6	4	0	0,0	0,0	0,0
	IL-4 Knockout	8	0	0,0	0,3	0,0
2000/11	C57Bl/6	3	3	6,3	2,3	1,0
	IL-4 Knockout	6	3	5,2	4,5	1,2
2003/6	C57Bl/6	5	3	3,6	2,7	0,4
	IL-4 Knockout	9	3	5,6	2,8	0,3
2004/22	C57Bl/6	4	3	3,8	3,4	0,8
	IL-4 Knockout	7	3	2,1	3,4	0,7
2000/11	C57Bl/6	3	8	5,0	4,8	1,3
	IL-4 Knockout	6	8	3,2	3,6	0,7
2003/6	C57Bl/6	4	8	3,0	2,8	0,2
	IL-4 Knockout	7	8	0,9	2,1	0,1
2004/22	C57Bl/6	4	8	2,0	3,0	0,8
	IL-4 Knockout	7	8	1,0	1,6	0,4
2000/11	C57Bl/6	3	21	0,0	2,5	0,7
	IL-4 Knockout	6	21	0,2	1,5	0,6
2003/6	C57Bl/6	5	21	0,4	1,3	0,0
	IL-4 Knockout	9	21	0,1	1,4	1,1
2004/22	C57Bl/6	4	21	0,0	1,1	0,5
	IL-4 Knockout	8	21	0,0	1,4	0,1

Nur in einer Studie bestanden zu zwei Zeitstufen signifikante Unterschiede.  
 Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.  
 Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt.

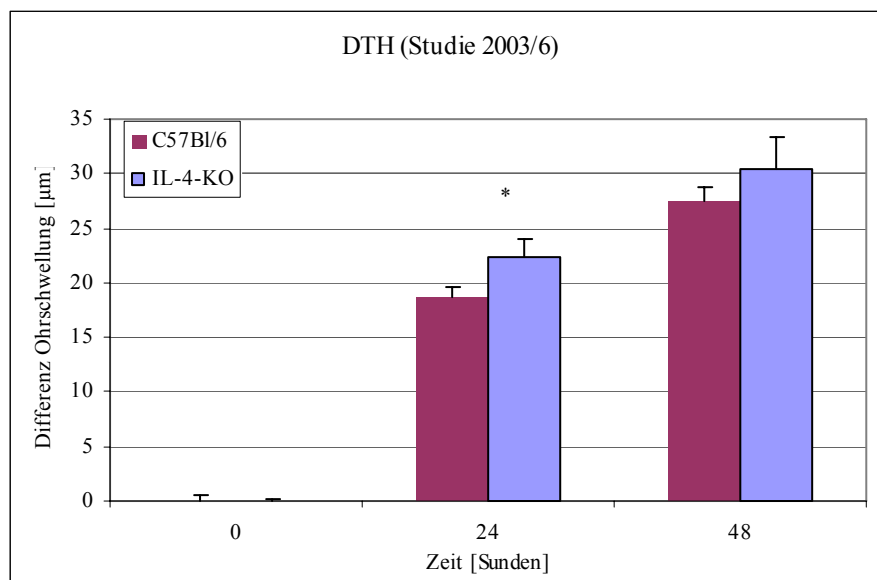
### 4.3 DTH-Reaktion

Um die zelluläre Immunität in vivo zu erfassen, wurde nach intradermaler Injektion des Antigens (mBSA) am Ohr die Ohrdicke zum Zeitpunkt der Induktion, nach 24 und nach 48 Stunden gemessen.

In fast allen Studien bestanden keine relevanten Unterschieden zwischen den Gruppen. Nur in einer Studie konnte nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden lag in dieser Studie die Ohrschwellung der KO-Mäuse signifikant über dem WT (Abb.12, Tab.10).



**Abb. 11** Die DTH-Reaktion wurde anhand der Ohrschwellung Nach 24 bzw. 48 Stunden ermittelt.



**Abb. 12** Nach 24 Stunden konnte in einer Studie eine signifikant stärkere Schwellung bei Den IL-4-Knockout-Mäusen festgestellt werden. In anderen Studien bestanden keine Gruppenunterschiede. (IL-4-KO: n=9; Wildtyp: n=5) (\* $p < 0,05$ , U-Test verglichen mit dem WT).

**Tab. 10.** DTH-Reaktion

		Anzahl Tiere	Stunden	
Studie	Stamm		24	48
2000/11	C57Bl/6	3	11,3	15,3
	IL-4 Knockout	6	11,3	18,2
2002/29	C57Bl/6	11	22,2	34,2
	IL-4 Knockout	11	19,9	30,6
2003/6	C57Bl/6	4	18,6	27,4
	IL-4 Knockout	9	22,4	30,3
2004/22	C57Bl/6	4	13,8	24,0
	IL-4 Knockout	8	13,5	21,9

Übersicht über bei der DTH bestimmte Differenzen der Ohrschwellung in  $\mu\text{m}$ .  
 Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.  
 Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt

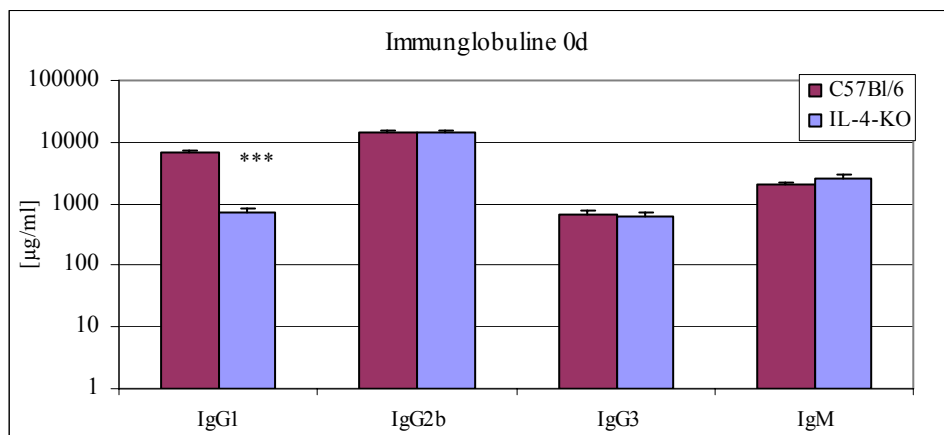
#### 4.4 Serumantikörper

Nach Serumgewinnung zu den einzelnen Zeitstufen wurden durch Sandwich-ELISA die Immunglobulin-Subklassen und antigenspezifischen Antikörper bestimmt. Die Darstellung ist nach Zeitstufen gruppiert. Aufgrund der z.T. sehr unterschiedlichen Konzentrationen erfolgt die graphische Darstellung logarithmisch.

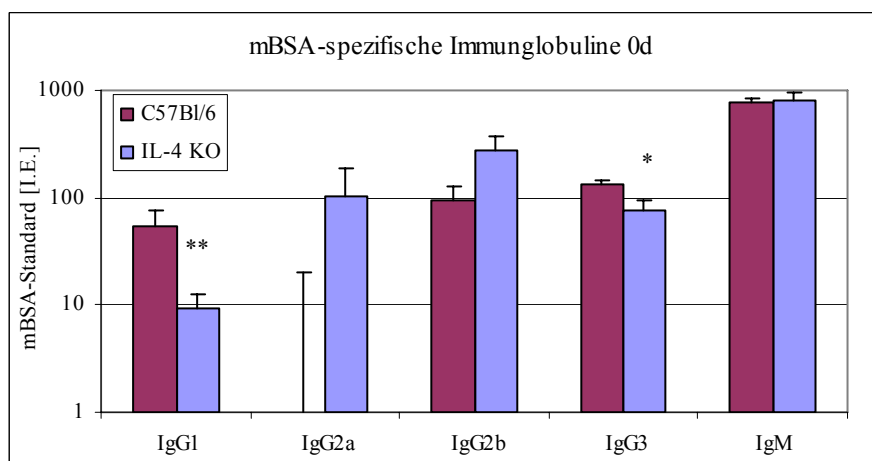
##### 4.4.1 Immunglobuline zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion (Tag 0)

Am Tag 0 kann das Ergebnis der Immunisierung und somit die immunologische Ausgangssituation für die Arthritisinduktion erfasst werden.

Zum Zeitpunkt der AIA-Induktion (Tag 0) wurde bei 3 Studien Serum von immunisierten Mäusen gewonnen. In allen drei Studien wurden bei IL-4-KO Mäusen, wie zu erwarten war signifikant geringere Mengen an Gesamt- und mBSA-spezifischem IgG1 gefunden. Die Immunglobulinspiegel lagen in einer Studie über den Werten der anderen beiden Studien (Abb.13, 14), die untereinander vergleichbar waren. In zwei Studien hatten die IL-4-KO-Mäuse höhere Titer der mBSA-spezifischen Immunglobuline. Eine Gesamtübersicht der Immunglobuline zum Zeitpunkt der Induktion ist in Tab.11 und Tab.12.



**Abb. 13** Zum Zeitpunkt der Induktion konnte nur für IgG1 ein signifikanter Unterschied reproduziert werden. Anzeige erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26 (IL-4-KO: n= 8; C57Bl/6: n=7) (\*\*p<0,001, U-Test verglichen mit dem WT).



**Abb. 14** Zum Zeitpunkt 0 Tage konnte nur für IgG1 ein signifikanter Unterschied reproduziert werden. Anzeige erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26 (IL-4-KO:n= 8; C57Bl/6: n=7) (\*p<0,05, \*\*p< 0,01, U-Test verglichen mit dem WT)

**Tab.11** Immunglobuline zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	IgG1	IgG2b	IgG3	IgM
2001/02	C57Bl/6	10	0	<b>616,0</b>	16821,6	<b>2749,7</b>	4525,1
	IL-4 Knockout	10	0	<b>2,9</b>	12983,8	<b>1338,1</b>	3136,7
2003/6	C57Bl/6	4	0	<b>511,7</b>	10973,9	1250,9	2362,7
	IL-4 Knockout	8	0	<b>110,1</b>	8609,8	<b>907,3</b>	<b>2006,9</b>
2004/26	C57Bl/6	7	0	<b>6724,8</b>	14114,3	693,2	2002,6
	IL-4 Knockout	8	0	<b>720,0</b>	<b>14400,0</b>	<b>629,1</b>	<b>2489,0</b>

Die Darstellung der unspezifischen Antikörper erfolgt in µg/ml. Der IgG1-Mangel der KO-Mäuse war in jeder Studie nachweisbar. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.



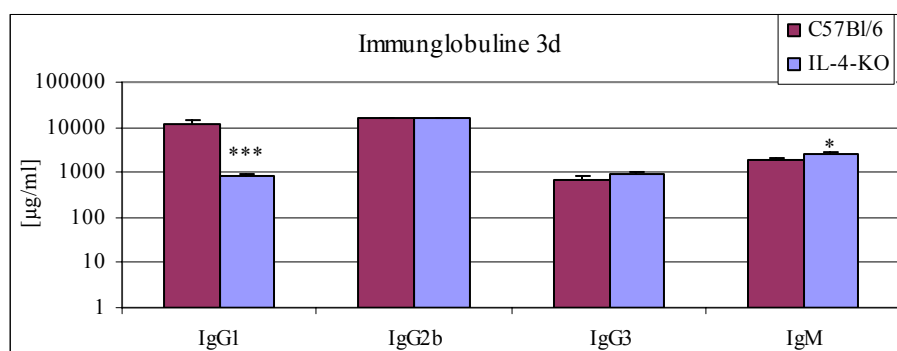
**Tab.12** Die mBSA-spezifischen Immunglobuline zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	mBSA IgG1	mBSA IgG2a	mBSA IgG2b	mBSA IgG3	mBSA IgM
2001/02	C57Bl/6	10	0	<b>616,0</b>	742,5	111,8	101,4	1218,5
	IL-4 Knockout	10	0	<b>2,9</b>	2629,9	398,3	145,5	1729,1
2003/6	C57Bl/6	4	0	<b>20,9</b>	0,0	303,1	2218,4	<b>3218,4</b>
	IL-4 Knockout	8	0	<b>0</b>	0,0	279,8	2152,3	<b>1044,6</b>
2004/26	C57Bl/6	7	0	<b>54,2</b>	1,0	93,7	<b>130,4</b>	764,4
	IL-4 Knockout	8	0	<b>9,2</b>	101,8	272,2	<b>77,7</b>	798,5

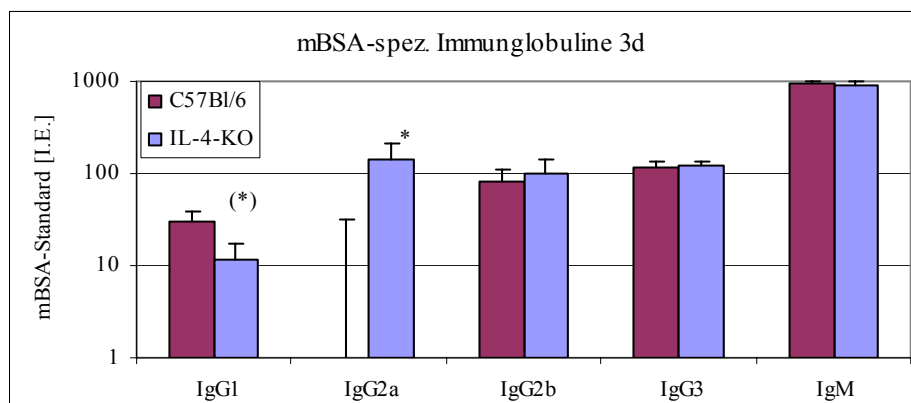
Die mBSA-spezifischen Antikörper werden in imaginären Einheiten [I.E.] in Relation zu einem Standard-Serum dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

#### 4.4.2 Immunglobuline 3 Tage AIA

Die Immunglobuline der akuten Entzündungsphase wurden in vier Studien erfasst. In einer Studie lagen alle Immunglobuline der KO-Mäuse außer IgM signifikant unter den WT-Mäusen, wobei sich diese Daten in den anderen Studien nicht bestätigen ließen. Der IgM-Titer der KO-Mäuse konnte in zwei Studien signifikant bzw. begrenzt signifikant geringer nachgewiesen werden, wobei in einer Studie die KO-Maus insgesamt deutlich geringere Antikörper-Spiegel hatte. In zwei Studien zeigte sich ein signifikant höherer Spiegel der mBSA-spezifischen IgG2a-Antikörper bei der KO-Maus, der in einer weiteren Studie als Tendenz bestand. Die IL-4-KO-Mäuse hatten außer bei IgM meist höhere Spiegel der unspezifischen und mBSA-spezifischen Immunglobuline. Repräsentative Beispiele sind in Abb. 15 und Abb. 16 dargestellt. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 13 und 14 aufgeführt.



**Abb. 15** Zum Zeitpunkt 3 Tage AIA konnte für IgG1 ein signifikanter Unterschied gezeigt werden, der in anderen Studien reproduzierbar war. Anzeige erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26 (IL-4-KO: n= 8; C57Bl/6: n=6) (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , U-Test verglichen mit dem WT).



**Abb. 16** Zum Zeitpunkt 3 Tage AIA konnte für IgG1 und IgG2a ein signifikanter Unterschied gezeigt werden, der in anderen Studien reproduzierbar war. Anzeige erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26 (IL-4-KO: n= 8; C57Bl/6: n=6) ((\* $p < 0,1$ , \* $p < 0,05$ , U-Test verglichen mit dem WT).

**Tab.13** Immunglobuline zum Zeitpunkt 3 Tage AIA.

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	IgG1	IgG2b	IgG3	IgM
2000/11	C57Bl/6	3	3	<b>4195,8</b>	30676,6	1651,0	3726,5
	IL-4 Knockout	6	3	<b>313,9</b>	<b>35910,8</b>	<b>2469,0</b>	<b>2619,2</b>
2003/6	C57Bl/6	5	3	<b>562,1</b>	<b>12252,2</b>	<b>1466,8</b>	3115,4
	IL-4 Knockout	9	3	<b>51,8</b>	<b>9319,3</b>	<b>899,6</b>	<b>1490,3</b>
2004/22	C57Bl/6	4	3	<b>4183,3</b>	6345,2	636,1	1839,0
	IL-4 Knockout	7	3	<b>0,0</b>	<b>7616,5</b>	<b>767,7</b>	<b>2136,3</b>
2004/26	C57Bl/6	6	3	<b>11324,2</b>	15427,8	713,6	<b>1946,5</b>
	IL-4 Knockout	8	3	<b>820,0</b>	<b>15714,8</b>	<b>940,7</b>	<b>2509,0</b>

Die Darstellung der unspezifischen Antikörper erfolgt in  $\mu\text{g/ml}$ . Der IgG1-Mangel der KO-Mäuse war in jeder Studie nachweisbar. Der in zwei Studien geringere IgM-Titer der KO-Maus war in Studie 2004/22 und 2004/26 höher. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

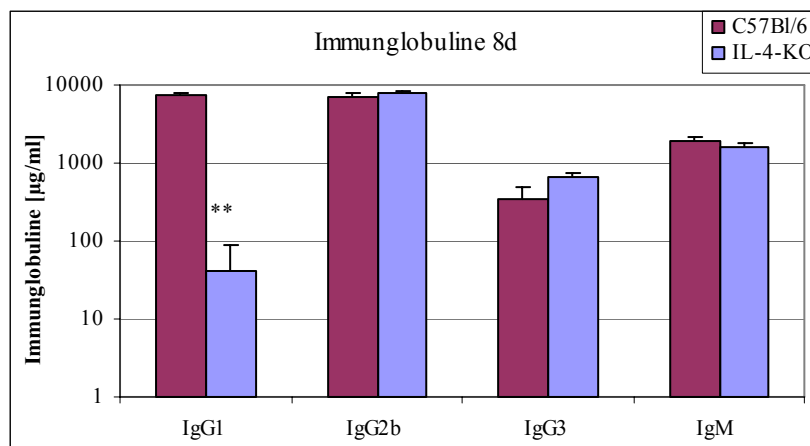
**Tab. 14** mBSA-spezifische Immunglobuline zum Zeitpunkt 3 Tage AIA.

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	mBSA IgG1	mBSA IgG2a	mBSA IgG2b	mBSA IgG3	mBSA IgM
2000/11	C57Bl/6	3	3	<b>18,8</b>	<b>0,0</b>	71,1	327,0	982,2
	IL-4 Knockout	6	3	<b>0,0</b>	<b>1639,0</b>	<b>171,7</b>	<b>377,0</b>	<b>511,0</b>
2003/6	C57Bl/6	5	3	<b>91,3</b>	0,0	552,5	2160,5	4606,8
	IL-4 Knockout	9	3	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>591,6</b>	<b>2226,5</b>	<b>0,0</b>
2004/22	C57Bl/6	4	3	<b>69,5</b>	1,0	33,7	3,6	840,2
	IL-4 Knockout	7	3	<b>1,0</b>	<b>36,7</b>	<b>1,0</b>	<b>14,6</b>	<b>866,1</b>
2004/26	C57Bl/6	6	3	29,5	<b>1,0</b>	81,5	116,1	927,7
	IL-4 Knockout	8	3	<b>11,4</b>	<b>143,4</b>	<b>99,6</b>	<b>125,0</b>	<b>903,9</b>

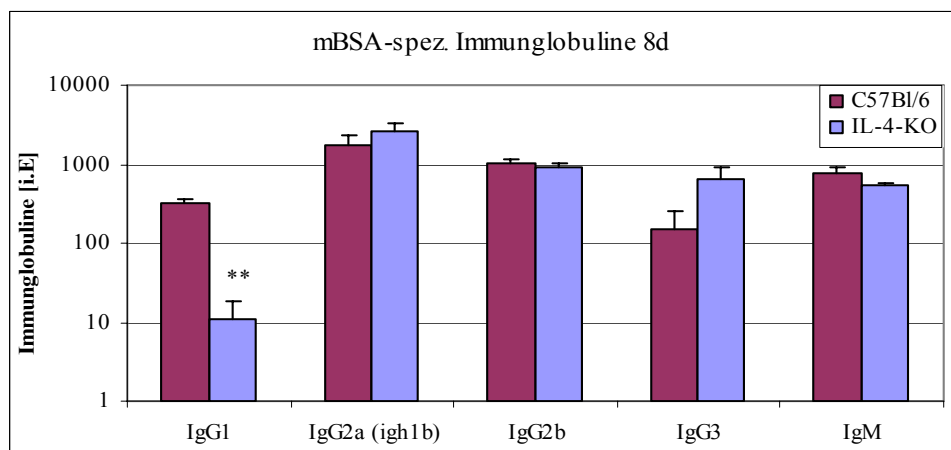
Die mBSA-spezifischen Antikörper werden in imaginären Einheiten [I.E.] in Relation zu einem Standard-Serum bestimmt. Auch bei den mBSA-spezifischen Immunglobulinen bestand in allen Studien ein geringerer IgG1-Spiegel der IL4-KO-Mäuse. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

#### 4.4.3 Immunglobuline 8 Tage AIA

Die Immunglobuline 8 Tage nach Induktion der AIA wurden in 4 Studien erfasst. Zu dieser Zeitstufe konnte in allen Studien beim IL-4-KO signifikant geringere Mengen Gesamt- und mBSA-spezifisches IgG1 nachgewiesen werden (Abb. 17, 18). Tendenziell höhere Spiegel des unspezifischen IgG2b und IgG3 des IL-4-KO waren nicht signifikant. Die nur in einzelnen Studien nachweisbaren Unterschiede konnten nicht reproduziert werden (Tab.15 + 16).



**Abb. 17** Zum Zeitpunkt 8 Tage AIA konnte in allen Studien für IgG1 eine signifikante Verringerung bei den IL-4-KO-Mäusen gezeigt werden. Darstellung erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/22 (IL-4-KO: n= 7; C57Bl/6: n=4) (\*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT)



**Abb. 18** Zum Zeitpunkt 8 Tage AIA konnte für mBSA-spezifische Antikörper in allen Studien für IgG1 eine signifikante Verringerung bei den IL-4-KO-Tieren gezeigt werden. Darstellung erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/22 (IL-4-KO: n= 7; C57Bl/6: n=4) (\*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT)

**Tab. 15** Immunglobuline zum Zeitpunkt 8 Tage AIA.

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	IgG1	IgG2b	IgG3	IgM
2000/11	C57Bl/6	3	8	<b>1428,0</b>	23879,3	941,3	1453,5
	IL-4 Knockout	6	8	<b>195,7</b>	<b>43083,8</b>	<b>1765,2</b>	<b>1427,7</b>
2002/29	C57Bl/6	11	8	<b>3248,4</b>	7595,5	852,3	2013,2
	IL-4 Knockout	11	8	<b>0</b>	<b>6993,0</b>	<b>911,2</b>	<b>1634,0</b>
2003/6	C57Bl/6	4	8	<b>1134,1</b>	9372,7	1016,0	1620,6
	IL-4 Knockout	7	8	<b>40,1</b>	<b>11217,5</b>	<b>716,0</b>	<b>1478,8</b>
2004/22	C57Bl/6	4	8	<b>7230,2</b>	7114,4	346,6	1887,6
	IL-4 Knockout	7	8	<b>40,5</b>	<b>7808,8</b>	<b>657,9</b>	<b>1558,6</b>

Die Darstellung der unspezifischen Antikörper erfolgt in µg/ml. Der IgG1-Mangel der KO-Mäuse war in jeder Studie nachweisbar. IgG2b und IgG3 waren beim IL-4-KO tendenziell höher. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

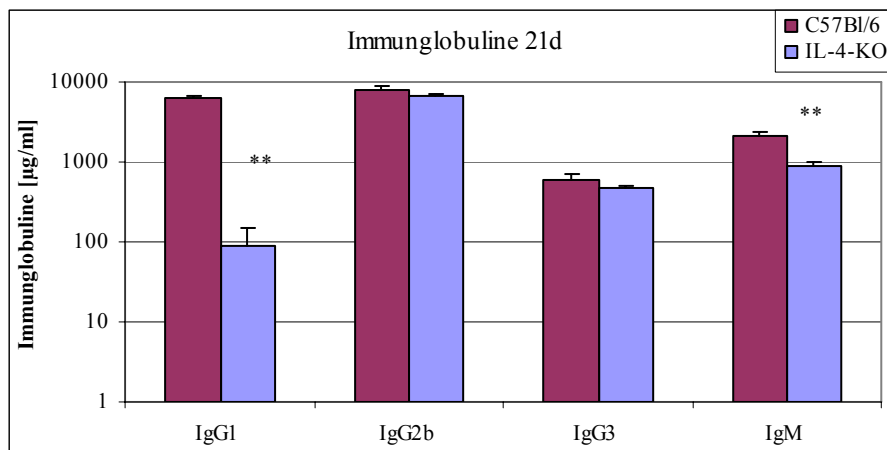
**Tab. 16** mBSA-spezifische Immunglobuline zum Zeitpunkt 8 Tage AIA.

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	mBSA IgG1	mBSA IgG2a	mBSA IgG2b	mBSA IgG3	mBSA IgM
2000/11	C57Bl/6	3	8	<b>128,1</b>	17456,0	1295,1	111,1	436,6
	IL-4 Knockout	6	8	<b>25,7</b>	<b>10150,7</b>	<b>1071,4</b>	<b>284,7</b>	<b>986,8</b>
2002/29	C57Bl/6	11	8	<b>48,7</b>	2885,5	6324,3	0,0	<b>799,9</b>
	IL-4 Knockout	11	8	<b>6,6</b>	<b>4853,3</b>	<b>8282,9</b>	<b>415,7</b>	<b>343,1</b>
2003/6	C57Bl/6	4	8	<b>530,4</b>	0,0	4277,5	2666,7	2123,4
	IL-4 Knockout	7	8	<b>7,1</b>	0,0	<b>1386,0</b>	<b>1920,5</b>	<b>0,0</b>
2004/22	C57Bl/6	4	8	<b>313,0</b>	1784,8	1003,7	150,1	765,3
	IL-4 Knockout	7	8	<b>11,1</b>	<b>2675,0</b>	<b>912,2</b>	<b>633,5</b>	<b>527,0</b>

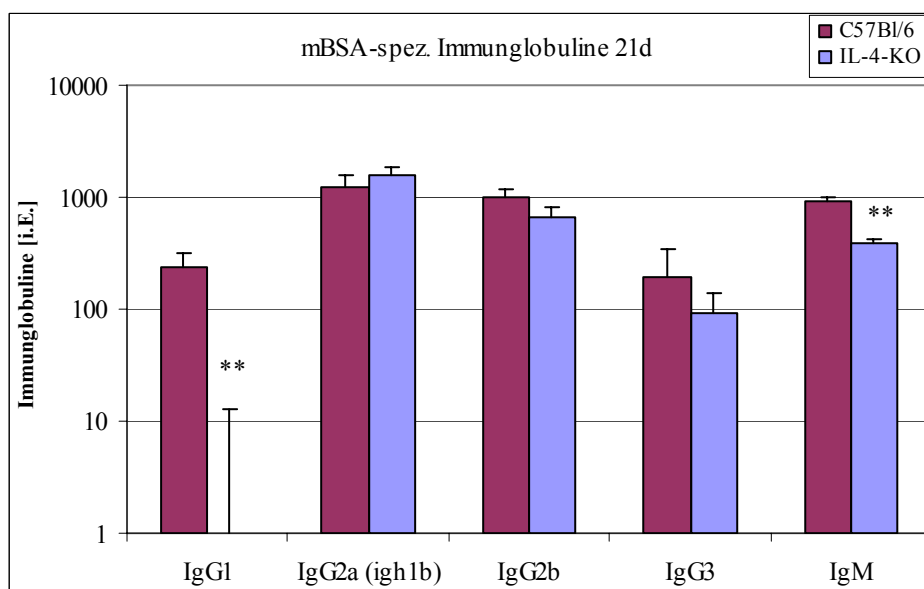
Die mBSA-spezifischen Antikörper werden in imaginären Einheiten [I.E.] in Relation zu einem Standard-Serum dargestellt. Auch bei den mBSA-spezifischen Immunglobulinen besteht in allen Studien ein geringerer IgG1-Spiegel. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

#### 4.4.4 Immunglobuline 21 Tage AIA

Die Immunglobuline nach 21 Tagen AIA-Dauer wurden in 3 Studien erfasst. Die zu anderen Zeitstufen erhöhten unspezifischen Immunglobuline der IL-4-KO-Maus lagen in allen Studien unter dem WT. In allen drei Studien war IgG1 bei der IL4-KO-Maus niedriger, wobei dies in einer Studie für mBSA-spezifisches IgG1 nicht signifikant war. Bei zwei Studien konnte bei IgM gesamt und mBSA-spezifisch eine signifikante Reduktion bei der KO-Maus nachgewiesen werden (Abb. 19, 20). Eine Gesamtübersicht ist in den Tabellen 17 und 18. In Studie 2003/06 war zum Zeitpunkt 21 Tage AIA beim IL-4-KO kein mBSA-spezifisches IgM nachweisbar, was wahrscheinlich in einem technischen Fehler begründet ist.



**Abb. 19** Zum Zeitpunkt 21 Tage AIA konnte in allen Studie für IgG1 und in zwei Studien für IgM eine signifikante Verringerung beim IL-4-KO gezeigt werden. Darstellung erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/22 (IL-4-KO: n= 8; C57Bl/6: n=4) ( \*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT)



**Abb. 20** Zum Zeitpunkt 21 Tage AIA konnte in allen Studie für mBSA-spezifisches IgG1 und in zwei Studien für IgM ein signifikant geringerer Titer beim IL-4-KO gezeigt werden. Darstellung erfolgt logarithmisch. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/22 (IL-4-KO:n= 8; C57Bl/6: n=4) (\*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT)

**Tab.17** Immunglobuline zum Zeitpunkt 21 Tage AIA.

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	IgG1	IgG2b	IgG3	IgM
2000/11	C57Bl/6	3	21	<b>3153,6</b>	32775,7	2645,6	1880,5
	IL-4 Knockout	6	21	<b>0,0</b>	14300,0	1861,9	1036,9
2003/6	C57Bl/6	5	21	<b>1401,5</b>	9954,5	1147,6	<b>2180,6</b>
	IL-4 Knockout	9	21	<b>8,3</b>	8111,1	866,6	<b>1177,5</b>
2004/22	C57Bl/6	4	21	<b>6199,0</b>	7960,6	603,1	<b>2116,1</b>
	IL-4 Knockout	8	21	<b>87,0</b>	6621,6	471,4	<b>867,8</b>

Die Darstellung der unspezifischen Antikörper erfolgt in µg/ml. Der IgG1-Mangel der KO-Mäuse war in jeder Studie nachweisbar. Die IL-4-KO-Mäuse hatten niedrigere Titer aller unspezifischen Immunglobuline. In zwei Studien bestand ein signifikanter IgM-Mangel bei der KO-Maus. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

**Tab. 18** mBSA-spezifische Immunglobuline zum Zeitpunkt 21 Tage AIA.

Studie	Stamm	Anzahl Tiere	Tag	mBSA IgG1	mBSA IgG2a	mBSA IgG2b	mBSA IgG3	mBSA IgM
2000/11	C57Bl/6	3	21	64,6	2700,7	437,1	82,5	<b>563,2</b>
	IL-4 Knockout	6	21	<b>9,4</b>	9954,6	1220,7	174,7	<b>247,6</b>
2003/6	C57Bl/6	5	21	<b>430,3</b>	0,0	3199,7	4750,7	3055,2
	IL-4 Knockout	9	21	<b>0,0</b>	0,0	2147,6	2194,2	<b>0,0</b>
2004/22	C57Bl/6	4	21	<b>236,1</b>	1249,5	1009,0	195,7	<b>918,8</b>
	IL-4 Knockout	8	21	<b>1,0</b>	1582,9	662,2	93,2	<b>385,7</b>

Die mBSA-spezifischen Antikörper werden in imaginären Einheiten [I.E.] in Relation zu einem Standard-Serum dargestellt. Auch bei den mBSA-spezifischen Immunglobulinen besteht in allen Studien ein geringerer IgG1-Spiegel des IL-4-KO. Der IgM-Spiegel der KO-Maus lag in allen Studien unter dem WT, wobei dies in zwei Studien signifikant war. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt

#### 4.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Immunglobuline

Zu allen Zeitstufen lag der unspezifische- und mBSA-spezifische IgG1-Spiegel der IL-4-KO-Mäuse unter dem des Wildtyps. Dieses Ergebnis war aufgrund der Bedeutung von IL-4 für den Isotypenwechsel zu IgG1 zu erwarten. Die Spiegel des mBSA-spezifischen IgG2a lagen beim IL-4-KO zu allen Zeitstufen meist deutlich über dem Wildtyp. Der geringere Titer des unspezifischen IgG2b zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion war zu den Zeitpunkten 3 Tage AIA und 8 Tage AIA tendenziell eher über dem Wildtyp. Beim mBSA-spezifischen IgG2b lagen die KO-Mäuse bis Tag 3 über dem Wildtyp, dieses Verhältnis kehrte sich ab Tag 8 tendenziell um. Außer an Tag 3 lag der Titer des unspezifischen IgM der IL-4-KO-Mäuse z.T. signifikant unter dem des Wildtyps. Die IL-4-KO-Mäuse hatten bereits zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion tendenziell höhere Titer der mBSA-spezifischen Antikörper, wobei sich

diese Erhöhung in der akuten Phase (3d AIA) auch bei den unspezifischen Antikörpern noch verdeutlichte und zum Tag 21 wieder abnahm.

## 4.5 Zytokine

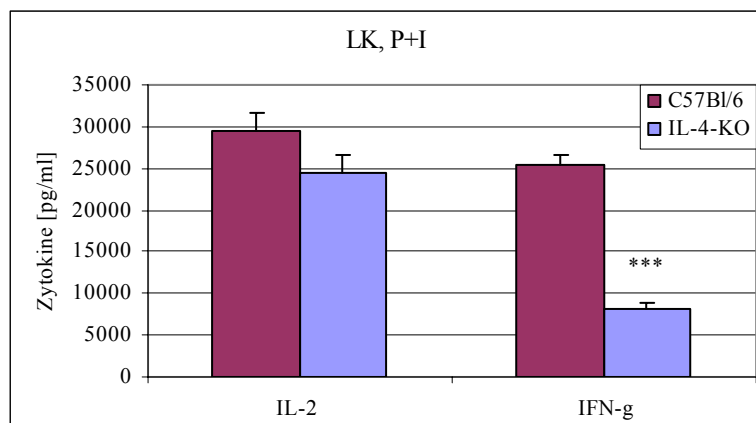
Zu den Zeitstufen Induktion der AIA (Tag 0) und 3, 8 und 21 Tage nach Auslösung der Arthritis wurden die Lymphknoten und die Milz steril entnommen und die Zellen der Organe unter einer Laminarbox herauspräpariert. In einer Zellkultur wurden die Zellen über 42 Stunden in einem Brutschrank kultiviert und mit Antigen oder unterschiedlichen Mitogenen stimuliert. Die Stimulation erfolgte durch das verwendete Antigen mBSA oder Concanavalin A (ConA) oder Phorbolmyristatacetat (PMA) mit Ionomycin (P+I). Die Zytokine der Überstände wurden mittels Sandwich-ELISA nachgewiesen. Um die Immunantwort zu charakterisieren, wurden die TH1-typischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  bestimmt. Die TH2-Antwort wurde anhand der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 beschrieben. Die Darstellung erfolgt nach Zeitstufen gruppiert.

### 4.5.1 Zytokine zum Zeitpunkt der Arthritis-Induktion

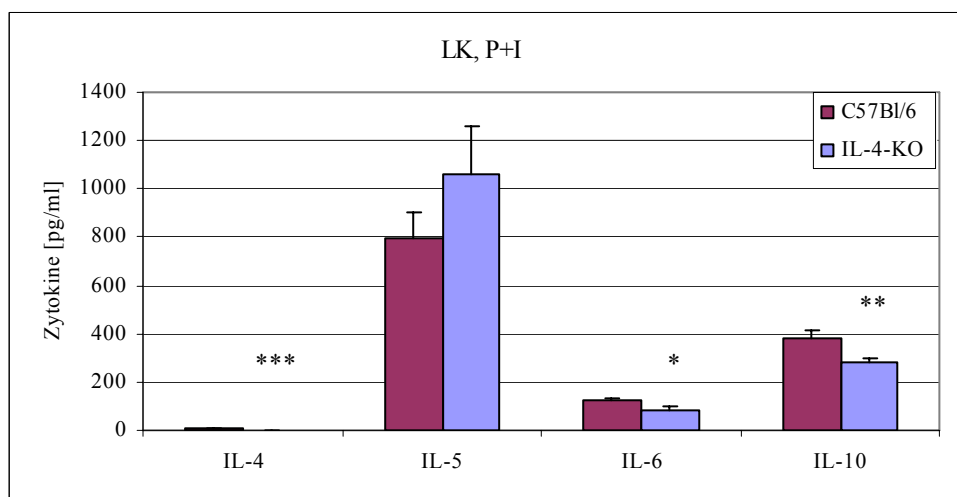
In zwei Studien wurden die Zytokine zum Zeitpunkt der Induktion erfasst. Hierbei konnten in den Lymphknoten- und Milzzellen bei IL-4-KO-Mäusen nach P+I- und ConA-Stimulation verminderte IFN- $\gamma$ -Spiegel gesehen werden, was nur in einer Studie in den Lymphknoten signifikant war (Abb. 21). Bei den TH2-typischen Zytokinen waren bei Lymphknoten- und Milzzellen der IL-4-KO-Mäuse z.T. signifikant geringere IL-4- und IL-6-Spiegel nachweisbar (Abb. 22). Der in Abb. 22 dargestellte geringere IL-10-Spiegel der IL-4-KO-Mäuse war nicht signifikant reproduzierbar. Die IL-4-Spiegel der WT-Mäuse waren in allen Studien nur sehr gering und fehlte bei IL-4-KO-Mäusen völlig.

Nach P+I- und ConA-Stimulation konnte in beiden Studien bei den Milzzellen ein höherer IL-2-Spiegel der IL-4-Knockout-Mäuse gesehen werden, welcher nach ConA-Stimulation signifikant höher war (Abb.23). Die mBSA-Stimulation führte nur zu sehr geringen bis zu nicht nachweisbaren Zytokin-Spiegeln.

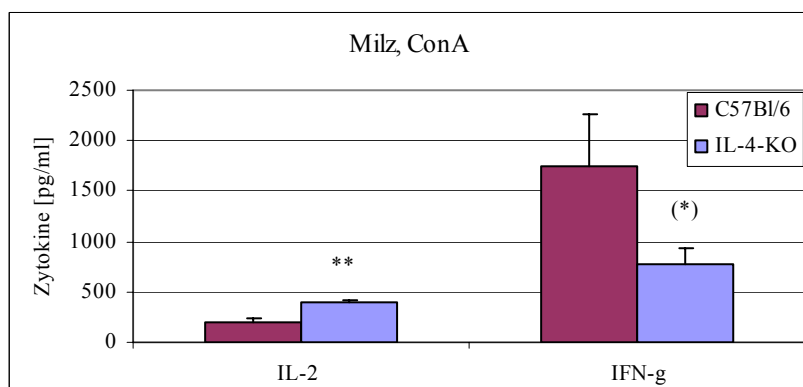
Alle Ergebnisse sind in Tabelle 19 und 20 dargestellt.



**Abb. 21** Zum Zeitpunkt 0 Tage konnten bei IL-4-KO-Mäuse in Lymphknotenzellen (LK) nach P+I-Stimulation signifikant geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel gesehen werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26, LK-Zellen (IL-4-KO: n= 8; C57Bl/6: n=7) (\*\*\*) $p < 0,001$ , U-Test verglichen mit dem WT)



**Abb. 22** Zum Zeitpunkt 0 Tage konnten bei IL-4-KO-Mäusen in Lymphknotenzellen (LK) nach P+I-Stimulation signifikant geringere IL-4- und IL-6-Spiegel gesehen werden. Der IL-10 Spiegel konnte nicht reproduziert werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26, LK-Zellen (IL-4-KO: n= 8; C57Bl/6: n=7) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , U-Test verglichen mit dem WT)



**Abb. 23** Zum Zeitpunkt 0 Tage konnten in Milzzellen von IL-4-KO-Mäusen nach ConA-Stimulation signifikant höhere IL-2-Spiegel gesehen werden. Der IFN $\gamma$ -Spiegel konnte nicht reproduziert werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26, Milz-Zellen (IL-4-KO: n= 8; C57Bl/6: n=7) ((\*) $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT).



**Tab. 19.** Zytokine aus Lymphknotenzellen zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion.

0d LK		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2001/02	C57Bl/6	10	P+I	8888,8	<b>41,8</b>	28,4	<b>252,8</b>	<b>70,6</b>	5271,9
	IL-4 Knockout	10	P+I	8812,5	<b>0,0</b>	0,0	<b>146,3</b>	<b>259,3</b>	3506,3
2004/26	C57Bl/6	7	P+I	29518,8	<b>6,0</b>	791,5	<b>126,6</b>	<b>382,1</b>	<b>25448,6</b>
	IL-4 Knockout	8	P+I	24341,5	<b>1,0</b>	<b>1063,7</b>	<b>84,1</b>	<b>278,6</b>	<b>8078,8</b>
2001/02	C57Bl/6	10	ConA	1539,6	<b>23,8</b>	<b>61,8</b>	<b>365,5</b>	<b>9,1</b>	153,6
	IL-4 Knockout	10	ConA	1142,7	<b>2,1</b>	<b>0,0</b>	<b>66,7</b>	<b>150,7</b>	12,8
2004/26	C57Bl/6	7	ConA	<b>314,4</b>	1,4	80,7	30,6	98,5	4805,9
	IL-4 Knockout	8	ConA	<b>694,6</b>	1,0	<b>85,8</b>	22,3	82,8	3601,8
2001/02	C57Bl/6	10	mBSA	428,9	3,8	0,0	<b>74,5</b>	<b>0,0</b>	1576,4
	IL-4 Knockout	10	mBSA	278,0	<b>0,0</b>	0,0	<b>0,0</b>	<b>60,1</b>	495,0
2004/26	C57Bl/6	7	mBSA	223,7	0,0	25,6	1,0	19,3	176,3
	IL-4 Knockout	8	mBSA	181,8	0,0	16,1	1,0	16,4	134,5

Zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion wurden in zwei Studien nach unterschiedlicher Stimulation die Zytokine der Lymphknoten bestimmt. Die KO-Mäuse zeigten bei fehlendem IL-4 nach P+I-Stimulation eine deutliche Schwächung der TH2-Antwort. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

**Tab. 20.** Zytokine aus Milzzellen zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion.

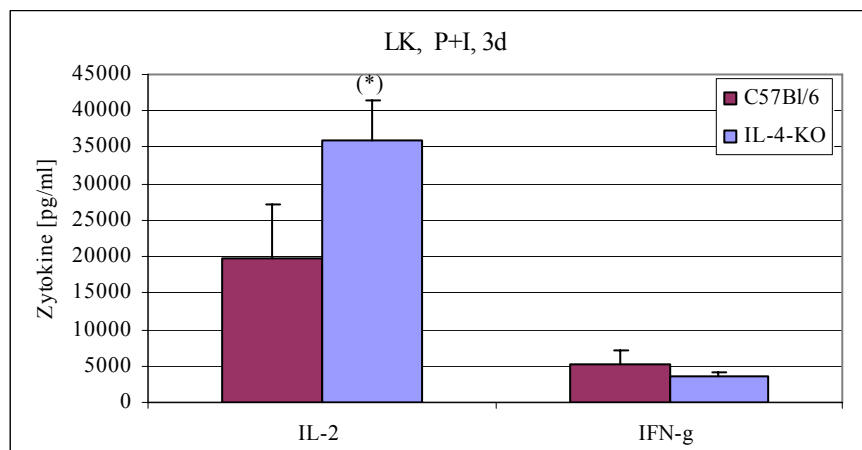
0d Milz		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2001/02	C57Bl/6	10	P+I	5334,2	8,8	51,4	252,3	425,3	8558,8
	IL-4 Knockout	10	P+I	<b>5840,2</b>	4,4	20,6	192,4	<b>439,9</b>	<b>4987,1</b>
2004/26	C57Bl/6	7	P+I	11197,4	<b>39,6</b>	86,7	343,0	554,2	14252,9
	IL-4 Knockout	8	P+I	<b>11236,4</b>	<b>1,0</b>	61,6	249,7	452,5	<b>10527,5</b>
2001/02	C57Bl/6	10	ConA	<b>411,0</b>	<b>49,8</b>	0,0	331,5	<b>159,4</b>	0,0
	IL-4 Knockout	10	ConA	<b>1219,8</b>	<b>0,9</b>	0,0	243,5	<b>5,5</b>	0,0
2004/26	C57Bl/6	7	ConA	<b>193,7</b>	<b>8,2</b>	12,4	<b>117,2</b>	109,5	1749,5
	IL-4 Knockout	8	ConA	<b>394,6</b>	<b>1,0</b>	2,3	<b>33,1</b>	83,0	<b>771,3</b>
2001/02	C57Bl/6	10	mBSA	51,8	<b>13,6</b>	0,0	0,0	73,2	0,0
	IL-4 Knockout	10	mBSA	41,2	<b>0,0</b>	0,0	0,0	72,0	0,0
2004/26	C57Bl/6	7	mBSA	174,7	0,0	<b>8,4</b>	33,8	60,9	<b>28,8</b>
	IL-4 Knockout	8	mBSA	163,2	0,0	<b>1,0</b>	9,5	60,6	<b>72,9</b>

Zum Zeitpunkt der Induktion wurden in zwei Studien nach unterschiedlicher Stimulation die Zytokine der Milzzellen bestimmt. Die KO-Mäuse zeigten nach P+I-Stimulation eine Schwächung der IFN- $\gamma$ -Antwort bei erhöhten IL-2-Spiegeln. Nach ConA-Stimulation hatte die KO-Maus in beiden Studien höhere IL-2-Titer. Bei den IL-4-KO-Mäusen zeigte sich durchgängig die Schwächung der TH2-Antwort. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

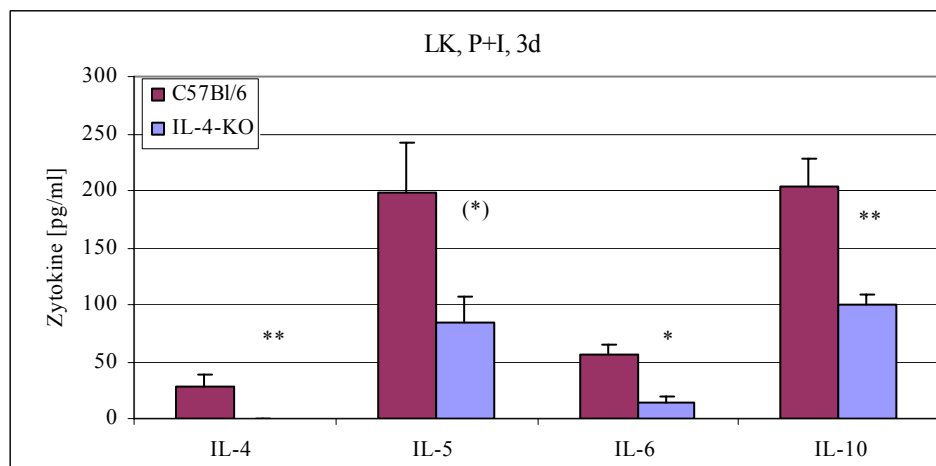
#### 4.5.2 Zytokine nach 3 Tagen AIA

Die Zytokine 3 Tagen nach Induktion der AIA wurden in 4 Studien erfasst. In einer Studie konnten nach P+I-Stimulation in Lymphknotenzellen signifikant höhere IL-2-Spiegel der KO-Maus gemessen werden (Abb. 24). Die IFN- $\gamma$ -Spiegel waren in allen Studien bei der KO-

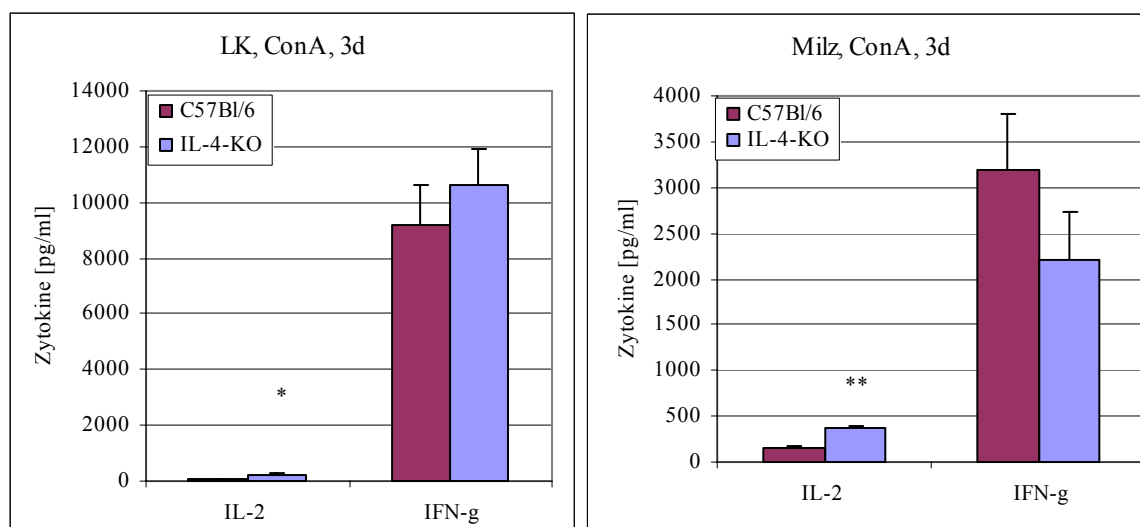
Maus nach P+I-Stimulation geringer, wobei diese Unterschiede nicht immer signifikant waren. In 2 Studien waren die TH2-Zytokine IL-4-, IL-5-, IL-6-Spiegel in den Lymphknotenzellen der KO-Maus deutlich niedriger, was in den Milzzellen nur in einer Studie signifikant nachgewiesen werden konnte, sich aber als deutliche Tendenz in allen Studien zeigte (Abb. 25). Die KO-Maus hatte tendenziell geringere Zytokin-Spiegel (Tab. 21+22). Nach ConA-Stimulation zeigten sich in 3 Studien bei den Lymphknotenzellen und in 2 Studien bei Milzzellen der KO-Mäuse signifikant höhere IL-2-Spiegel (Abb. 26 a,b).



**Abb. 24** Zum Zeitpunkt 3 Tage konnte nach P+I-Stimulation von Lymphknotenzellen (LK) ein höherer IL-2-Spiegel bei den KO-Mäusen gesehen werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2003/06, LK-Zellen (IL-4-KO: n= 9, C57Bl/6: n=5) ((\*) $p<0,1$ , U-Test verglichen mit dem WT).



**Abb. 25** Zum Zeitpunkt 3 Tage konnte in Lymphknotenzellen (LK) von IL-4-KO-Mäusen nach P+I-Stimulation ein signifikant verminderter IL-4- und IL-6-Spiegel und in zwei Studien ein geringerer IL-10-Spiegel bei den KO-Mäusen nachgewiesen werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/22, LK-Zellen (IL-4-KO: n= 7, C57Bl/6: n=4) ((\*) $p<0,1$ , \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT)



**Abb. 26 a/b** Zum Zeitpunkt 3 Tage AIA konnte nach ConA-Stimulation in 3 Studien bei Lymphknotenzellen (LK) und in allen Studien bei Milzzellen von IL-4-KO-Mäusen signifikant höhere IL-2-Spiegel der KO-Mäuse nachgewiesen werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/26, LK-Zellen (a), Milzzellen (b) (IL-4-KO: n=6, C57Bl/6: n=8) (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT).

**Tab.21** Zytokine aus Lymphknotenzellen zum Zeitpunkt 3 Tage AIA.

3d LK		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2000/11	C57Bl/6	3	P+I	10489,4	<b>11,8</b>	630,9	<b>117,8</b>	332,4	1897,1
	IL-4 Knockout	6	P+I	9900,6	<b>0,0</b>	233,4	<b>67,2</b>	206,7	1607,5
2003/6	C57Bl/6	5	P+I	19768,8	<b>24,8</b>	421,8	78,7	206,4	5204,6
	IL-4 Knockout	9	P+I	35975,7	<b>0,0</b>	565,5	<b>132,0</b>	249,1	3433,9
2004/22	C57Bl/6	4	P+I	11030,9	<b>28,2</b>	198,2	<b>56,0</b>	204,1	5200,9
	IL-4 Knockout	7	P+I	6126,5	<b>0,0</b>	84,1	<b>13,5</b>	100,2	726,9
2004/26	C57Bl/6	8	P+I	25471,3	36,3	800,8	85,4	<b>392,3</b>	<b>9845,6</b>
	IL-4 Knockout	6	P+I	24048,3	0,0	857,3	56,2	<b>246,6</b>	<b>3628,9</b>
2000/11	C57Bl/6	3	ConA	<b>241,9</b>	<b>10,9</b>	<b>182,3</b>	77,2	246,6	2574,9
	IL-4 Knockout	6	ConA	<b>659,8</b>	<b>0,3</b>	<b>51,3</b>	57,0	135,5	1161,6
2003/6	C57Bl/6	5	ConA	<b>101,8</b>	<b>2,4</b>	36,3	3,1	55,2	<b>265,0</b>
	IL-4 Knockout	9	ConA	<b>507,4</b>	<b>0,0</b>	<b>58,9</b>	<b>22,6</b>	<b>75,3</b>	<b>1199,3</b>
2004/22	C57Bl/6	4	ConA	142,0	<b>3,0</b>	<b>11,7</b>	0,0	<b>31,6</b>	<b>578,8</b>
	IL-4 Knockout	7	ConA	127,3	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	0,0	<b>13,4</b>	<b>127,3</b>
2004/26	C57Bl/6	8	ConA	<b>51,2</b>	<b>27,7</b>	142,9	56,9	192,2	9181,7
	IL-4 Knockout	6	ConA	<b>207,0</b>	<b>0,0</b>	127,8	52,2	143,8	<b>10652,5</b>
2000/11	C57Bl/6	3	mBSA	<b>119,2</b>	0,0	7,8	20,6	140,2	5552,4
	IL-4 Knockout	6	mBSA	<b>234,2</b>	0,0	0,0	1,2	71,1	4720,7
2003/6	C57Bl/6	5	mBSA	<b>6,2</b>	0,0	0,0	0,0	181,4	<b>0,0</b>
	IL-4 Knockout	9	mBSA	<b>106,4</b>	0,0	0,0	0,0	229,4	<b>562,2</b>
2004/22	C57Bl/6	4	mBSA	5,7	0,0	0,0	0,0	6,6	0,0
	IL-4 Knockout	7	mBSA	3,1	0,0	0,0	0,0	<b>11,3</b>	0,0
2004/26	C57Bl/6	8	mBSA	100,3	1,2	39,5	17,8	204,5	1151,1
	IL-4 Knockout	6	mBSA	93,3	0,0	9,3	6,7	110,9	<b>1239,0</b>

In der akuten Phase der AIA wurden in vier Studien nach unterschiedlicher Stimulation die Zytokine der Lymphknotenzellen bestimmt. Die KO-Mäuse zeigten nach P+I-Stimulation wie bereits zum Zeitpunkt der Induktion geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel und nach ConA-Stimulation höhere IL-2-Spiegel. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4- KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

**Tab. 22.** Zytokine aus Milzzellen zum Zeitpunkt 3 Tage AIA.

3d Milz		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2000/11	C57Bl/6	3	P+I	<b>6877,2</b>	<b>22,5</b>	0,0	0,0	404,0	5489,8
	IL-4 Knockout	6	P+I	<b>3682,1</b>	<b>0,0</b>	0,0	0,0	<b>272,4</b>	<b>3341,2</b>
2003/6	C57Bl/6	5	P+I	16587,5	<b>63,1</b>	<b>122,5</b>	<b>525,0</b>	<b>353,8</b>	<b>6870,8</b>
	IL-4 Knockout	9	P+I	<b>9732,6</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>258,6</b>	<b>173,0</b>	<b>2363,4</b>
2004/22	C57Bl/6	4	P+I	12692,6	<b>85,1</b>	144,6	323,5	404,1	<b>9333,9</b>
	IL-4 Knockout	7	P+I	<b>10565,5</b>	<b>0,0</b>	<b>63,5</b>	<b>256,3</b>	<b>372,9</b>	<b>4730,1</b>
2004/26	C57Bl/6	8	P+I	16174,4	<b>427,0</b>	100,8	275,0	530,6	8599,7
	IL-4 Knockout	6	P+I	<b>16140,0</b>	<b>0,0</b>	<b>85,0</b>	<b>239,6</b>	<b>453,1</b>	<b>6373,3</b>
2000/11	C57Bl/6	3	ConA	6877,2	<b>26,5</b>	0,0	0,0	71,5	5489,8
	IL-4 Knockout	6	ConA	<b>3682,1</b>	<b>0,0</b>	0,0	0,0	<b>12,3</b>	<b>3341,2</b>
2003/6	C57Bl/6	5	ConA	148,8	<b>11,3</b>	<b>10,2</b>	<b>226,5</b>	<b>73,9</b>	53,0
	IL-4 Knockout	9	ConA	<b>128,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>54,0</b>	<b>28,7</b>	<b>0,0</b>
2004/22	C57Bl/6	4	ConA	<b>191,6</b>	<b>21,2</b>	11,9	111,4	45,1	982,6
	IL-4 Knockout	7	ConA	<b>313,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>64,1</b>	<b>32,2</b>	<b>492,5</b>
2004/26	C57Bl/6	8	ConA	<b>150,9</b>	<b>160,5</b>	0,0	144,5	122,9	3198,3
	IL-4 Knockout	6	ConA	<b>368,3</b>	<b>0,0</b>	0,0	<b>82,9</b>	<b>73,6</b>	<b>2217,8</b>
2000/11	C57Bl/6	3	mBSA	32,5	4,9	0,0	0,0	62,5	345,5
	IL-4 Knockout	6	mBSA	<b>46,1</b>	<b>0,0</b>	0,0	0,0	<b>40,3</b>	1183,6
2003/6	C57Bl/6	5	mBSA	<b>111,8</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>220,8</b>
	IL-4 Knockout	9	mBSA	<b>45,0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>290,0</b>
2004/22	C57Bl/6	4	mBSA	10,4	1,6	0,0	8,3	42,9	10,4
	IL-4 Knockout	7	mBSA	<b>6,0</b>	<b>0,0</b>	0,0	<b>0,0</b>	<b>7,3</b>	<b>6,0</b>
2004/26	C57Bl/6	8	mBSA	121,5	0,0	0,0	52,7	46,6	3,2
	IL-4 Knockout	6	mBSA	<b>114,8</b>	0,0	0,0	<b>37,4</b>	<b>25,7</b>	10,6

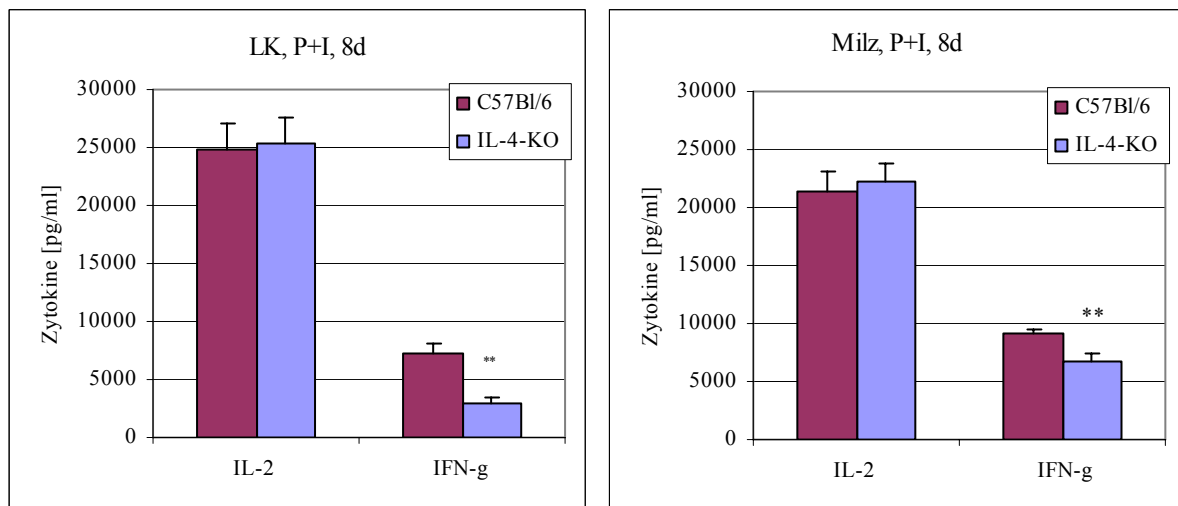
In der akuten Phase der AIA wurden in vier Studien nach unterschiedlicher Stimulation die Zytokine der Milzzellen bestimmt. Die KO-Mäuse zeigten nach P+I-Stimulation verminderte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Spiegel. Nach ConA Stimulation lagen die IL-2-Spiegel des IL-4-KO in einer Studie signifikant über dem WT. Die TH2-Antwort war geringer als beim WT. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

#### 4.5.3 Zytokine nach 8 Tagen AIA

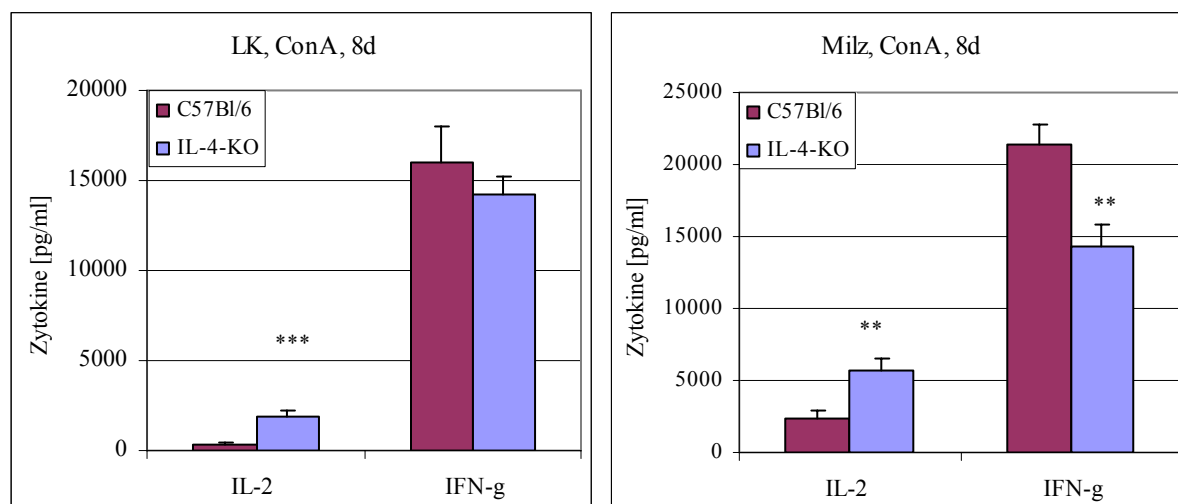
Nach 8 Tagen AIA wurden in insgesamt 3 Studien die Zytokin-Spiegel bestimmt. Hierbei konnten bei IL-4-KO-Mäusen in 2 Studien in LK-Zellen signifikant und in einer Studie tendenziell niedrigere IFN- $\gamma$ -Spiegel gesehen werden (Abb. 27 a,b). Dieser Trend setzte sich auch nach ConA-Stimulation fort. Die höheren IL-2-Spiegel der IL-4-KO-Mäuse waren nach P+I-Stimulation in einer Studie und nach ConA-Stimulation in 2 Studien signifikant. Die übrigen teils signifikanten Unterschiede waren nur Einzelwerte (Tab. 23, 24).

Die tendenziell niedrigeren IFN- $\gamma$ -Spiegel der KO-Mäuse bei den LK-Zellen waren nur vereinzelt signifikant (Abb. 28a/b).

Nach mBSA-Stimulation waren in 2 Studien bei den KO-Mäusen in LK- und Milzzellen höhere IFN- $\gamma$ -Spiegel und in 2 Studien einmal in Milzzellen und einmal in LK-Zellen signifikant höhere IL-2-Spiegel zu messen. Bei den TH2-Zytokinen war beim IL-4-KO kein und beim WT nur ein geringer IL-4-Spiegel messbar. Bei den Milzzellen lag der IL-5-Spiegel der IL-4-KO-Mäuse nach allen Stimulationen unter dem des WT. Für IL-6 und IL-10 fanden sich keine reproduzierbaren Unterschiede. In Tabelle 23 und 24 wurden signifikante Unterschiede fett gedruckt. In einer Studie (2004/22) konnten kulturbedingt keine Zytokine von Milzzellen bestimmt werden.



**Abb.27 a/b** Zum Zeitpunkt 8 Tage AIA konnte nach P+I-Stimulation in 2 Studien bei LK-Zellen und einer Studie bei Milzzellen ein signifikant geringerer IFN- $\gamma$ -Spiegel der KO-Mäuse nachgewiesen werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2002/29, LK-Zellen (a), Milzzellen (b) (IL-4 KO: n= 11, C57Bl/6: n=11) (\*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT).



**Abb.28 a/b** Zum Zeitpunkt 8 Tage AIA konnte nach ConA-Stimulation in 3 Studien bei LK-Zellen und zwei Studien bei Milzzellen ein signifikant höherer IL-2-Spiegel der KO-Mäuse nachgewiesen werden. Der geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel der KO-Maus konnte meist nur als Tendenz gesehen werden.

Exemplarisch gezeigt an Studie 2002/29, LK-Zellen (a), Milzzellen (b) (IL-4-KO: n= 11, C57Bl/6: n=11) (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , U-Test verglichen mit dem WT).

**Tab. 23** Zytokine nach 8 Tagen AIA aus Lymphknotenzellen.

8d LK		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2000/11	C57Bl/6	3	P+I	7613,3	<b>8,6</b>	740,2	102,4	201,5	842,9
	IL-4 Knockout	6	P+I	<b>8608,8</b>	<b>0,0</b>	455,6	70,7	191,4	763,8
2002/29	C57Bl/6	11	P+I	24818,1	<b>20,4</b>	943,4	96,0	219,3	<b>7167,1</b>
	IL-4 Knockout	11	P+I	<b>25336,1</b>	<b>1,2</b>	<b>1051,2</b>	<b>263,7</b>	<b>252,9</b>	<b>2992,9</b>
2004/22	C57Bl/6	4	P+I	<b>30752,8</b>	<b>3,0</b>	545,7	<b>276,1</b>	365,3	<b>16032,7</b>
	IL-4 Knockout	7	P+I	<b>37949,2</b>	<b>0,0</b>	<b>562,7</b>	<b>180,1</b>	<b>356,0</b>	<b>7060,0</b>
2000/11	C57Bl/6	3	ConA	419,2	<b>6,9</b>	122,9	61,5	74,8	5230,9
	IL-4 Knockout	6	ConA	802,1	<b>1,2</b>	102,4	52,6	<b>123,3</b>	4080,0
2002/29	C57Bl/6	11	ConA	<b>363,3</b>	<b>13,3</b>	<b>146,8</b>	37,4	150,0	16010,9
	IL-4 Knockout	11	ConA	<b>1941,9</b>	<b>0,0</b>	<b>272,1</b>	<b>200,6</b>	<b>192,2</b>	<b>14174,5</b>
2004/22	C57Bl/6	4	ConA	<b>1305,6</b>	<b>3,3</b>	73,1	157,9	141,8	<b>23236,7</b>
	IL-4 Knockout	7	ConA	<b>3729,3</b>	<b>0,0</b>	<b>77,5</b>	<b>131,9</b>	<b>102,9</b>	<b>6736,7</b>
2000/11	C57Bl/6	3	mBSA	324,4	0,0	0,0	90,1	12,6	1984,5
	IL-4 Knockout	6	mBSA	<b>483,1</b>	0,0	0,0	26,9	<b>53,3</b>	<b>6507,1</b>
2002/29	C57Bl/6	11	mBSA	<b>192,6</b>	<b>3,3</b>	58,3	65,0	<b>59,4</b>	<b>2092,3</b>
	IL-4 Knockout	11	mBSA	<b>379,5</b>	<b>0,0</b>	<b>33,9</b>	<b>123,6</b>	<b>111,8</b>	<b>10543,8</b>
2004/22	C57Bl/6	4	mBSA	489,8	0,9	40,6	43,1	93,2	792,3
	IL-4 Knockout	7	mBSA	476,7	<b>0,0</b>	16,4	13,6	90,3	781,0

Nach P+I- und ConA-Stimulation waren die IFN- $\gamma$ -Spiegel der KO-Mäuse tendenziell geringer. Nach mBSA-Stimulation kehrte sich dies z.T. um. Der IL-2-Titer war bei den KO-Mäusen bei allen Stimulationen z.T. signifikant höher. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

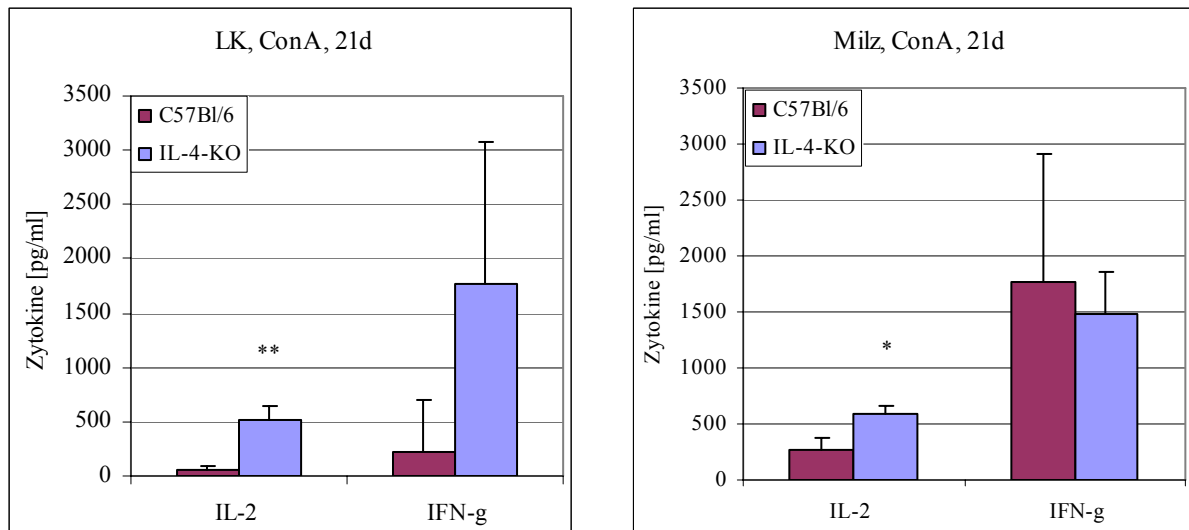
**Tab. 24** Zytokine nach 8 Tagen AIA aus Milzzellen.

8d Milz		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2000/11	C57Bl/6	3	P+I	5368,1	<b>12,2</b>	224,7	232,4	355,5	3032,0
	IL-4 Knockout	6	P+I	6344,6	<b>0,0</b>	174,3	391,6	608,0	5133,5
2002/29	C57Bl/6	11	P+I	24818,1	<b>36,8</b>	<b>350,4</b>	1653,8	541,1	<b>9157,5</b>
	IL-4 Knockout	11	P+I	25336,1	<b>0,0</b>	<b>76,8</b>	1274,0	430,4	<b>6780,0</b>
2000/11	C57Bl/6	3	ConA	<b>851,5</b>	<b>26,4</b>	65,5	<b>273,8</b>	155,2	5552,7
	IL-4 Knockout	6	ConA	<b>2757,1</b>	<b>0,0</b>	46,9	<b>515,5</b>	133,8	3535,1
2002/29	C57Bl/6	11	ConA	<b>2422,1</b>	<b>76,6</b>	<b>76,6</b>	1634,3	381,2	<b>21349,1</b>
	IL-4 Knockout	11	ConA	<b>5715,6</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	1293,3	276,6	<b>14238,2</b>
2000/11	C57Bl/6	3	mBSA	135,3	<b>8,9</b>	0,0	93,4	127,8	4007,4
	IL-4 Knockout	6	mBSA	225,0	<b>0,0</b>	0,0	218,7	142,1	11290,7
2002/29	C57Bl/6	11	mBSA	716,1	<b>57,0</b>	<b>379,7</b>	797,3	551,3	3163,8
	IL-4 Knockout	11	mBSA	960,0	<b>0,0</b>	<b>22,9</b>	604,5	308,7	7600,0

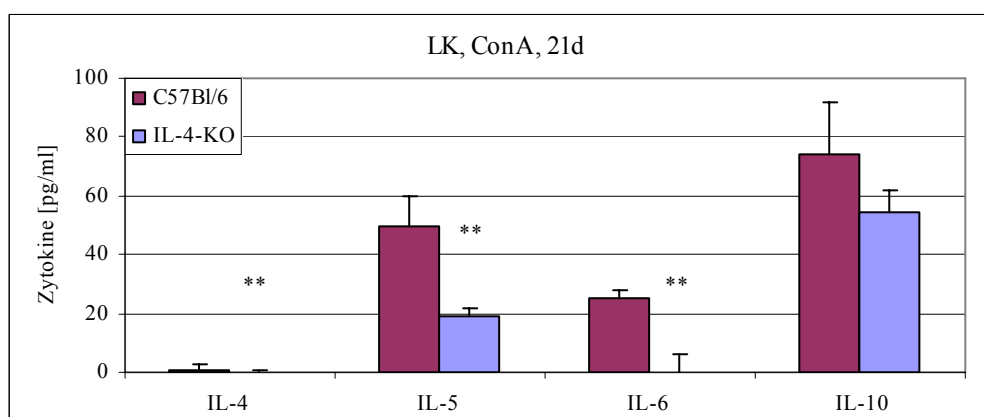
Für Studie 2004/22 konnten kulturbedingt keine Milzzellzytokine bestimmt werden. Nach P+I-, ConA- und mBSA-Stimulation lag die KO-Maus beim IL-2 z.T. signifikant über dem Wildtyp. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

#### 4.5.4 Zytokine nach 21 Tagen AIA

Die TH1/TH2-Balance in der chronischen Phase der AIA (21d) sollte in 3 Studien durch die Zytokine in Milz- und Lymphknotenzellen ermittelt werden. Hierbei konnten nach P+I-Stimulation bei der KO-Maus in Lymphknoten- und Milzzellen z.T. signifikant geringere IL-2-Spiegel und geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel bestimmt werden. Nach ConA-Stimulation zeigten die KO-Tiere in allen Studien im Gegensatz zur P+I-Stimulation deutlich höhere IL-2-Titer in Lymphknoten und Milzzellen (Abb. 29 a/b). Die Titer der TH2-Zytokine waren bei beiden Mausstämmen nur gering und die KO-Mäuse lagen wie zu den anderen Zeitstufen z.T. signifikant unter dem Wildtyp. Bei der mBSA-Stimulation konnten außer einem erhöhten IL-2 –Spiegel der IL-4-KO-Mäuse keine Unterschiede reproduziert werden (Abb. 30, Tab. 25, 26).



**Abb.29 a/b** Zum Zeitpunkt 21 Tage AIA konnten nach ConA-Stimulation in fast allen Studien bei LK- und Milzzellen signifikant höhere IL2-Spiegel der KO-Maus nachgewiesen werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2003/06, LK-Zellen (a), Milzzellen (b) (IL-4-KO: n= 9, C57Bl/6: n=5) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , U-Test verglichen mit dem WT).



**Abb. 30** Zum Zeitpunkt 21 Tage AIA konnte nach ConA-Stimulation in 2 Studien bei LK-Zellen signifikant geringere IL-4-, IL-5- und IL-6-Spiegel bei den KO-Mäusen nachgewiesen werden. Exemplarisch gezeigt an Studie 2004/22, LK-Zellen (IL-4-KO: n= 8, C57Bl/6: n=4) (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , U-Test verglichen mit dem WT).



**Tab. 25** Zytokine in der chronischen Phase der AIA (21d) aus Lymphknotenzellen.

21d LK		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2000/11	C57Bl/6	3	P+I	6131,0	<b>7,0</b>	<b>313,9</b>	34,2	138,6	0,0
	IL-4 Knockout	6	P+I	4510,6	<b>0,0</b>	<b>27,0</b>	10,0	116,0	0,0
2003/6	C57Bl/6	5	P+I	10326,8	<b>10,4</b>	428,1	24,7	169,4	3217,9
	IL-4 Knockout	9	P+I	6393,7	<b>0,0</b>	<b>521,7</b>	19,1	177,9	1089,0
2004/22	C57Bl/6	4	P+I	<b>23243,3</b>	<b>15,0</b>	571,8	<b>79,0</b>	377,1	<b>20032,1</b>
	IL-4 Knockout	8	P+I	<b>15370,7</b>	<b>0,0</b>	569,1	<b>0,0</b>	261,4	<b>2429,5</b>
2000/11	C57Bl/6	3	ConA	263,7	<b>10,8</b>	<b>191,9</b>	<b>37,1</b>	149,4	542,9
	IL-4 Knockout	6	ConA	501,7	<b>0,9</b>	<b>19,5</b>	<b>0,0</b>	84,9	----
2003/6	C57Bl/6	5	ConA	<b>53,0</b>	0,0	11,2	0,0	0,0	214,3
	IL-4 Knockout	9	ConA	<b>517,6</b>	0,0	<b>35,6</b>	0,0	<b>32,5</b>	<b>1767,1</b>
2004/22	C57Bl/6	4	ConA	<b>332,1</b>	<b>0,8</b>	<b>49,8</b>	<b>25,2</b>	74,0	<b>3769,2</b>
	IL-4 Knockout	8	ConA	<b>714,8</b>	<b>0,0</b>	<b>19,1</b>	<b>0,0</b>	54,3	<b>1199,0</b>
2000/11	C57Bl/6	3	mBSA	324,5	0,0	<b>20,9</b>	0,0	58,2	311,9
	IL-4 Knockout	6	mBSA	193,1	0,0	<b>0,0</b>	0,0	44,0	234,3
2003/6	C57Bl/6	5	mBSA	<b>11,2</b>	3,3	58,3	65,0	59,4	<b>0,0</b>
	IL-4 Knockout	9	mBSA	<b>208,5</b>	<b>0,0</b>	<b>33,9</b>	<b>123,6</b>	<b>111,8</b>	<b>119,8</b>
2004/22	C57Bl/6	4	mBSA	46,4	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
	IL-4 Knockout	8	mBSA	<b>145,2</b>	0,0	0,0	0,0	<b>13,8</b>	<b>94,9</b>

Nach P+I-Stimulation der Lymphknotenzellen (LK) sind bei der KO-Maus geringere IL-2 und IFN- $\gamma$ -Spiegel nachweisbar. Nach ConA-Stimulation zeigen sich im Gegensatz hierzu höhere IL-2-Spiegel der KO-Maus. Die TH2-Zytokinspiegel sind nur gering. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

**Tab. 26** Zytokine in der chronischen Phase der AIA (21d) aus Milzzellen.

21d Milz		Anzahl Tiere							
Studie	Stamm		Stim.	IL2	IL4	IL5	IL6	IL10	IFN $\gamma$
2000/11	C57Bl/6	3	P+I	3539,3	12,5	<b>178,5</b>	124,0	257,8	1411,4
	IL-4 Knockout	6	P+I	<b>3576,1</b>	1,0	<b>80,6</b>	104,4	219,7	834,1
2003/6	C57Bl/6	5	P+I	17986,4	<b>45,7</b>	209,1	428,5	276,9	6523,8
	IL-4 Knockout	9	P+I	15469,7	<b>0,0</b>	70,1	369,8	<b>282,3</b>	4959,9
2004/22	C57Bl/6	4	P+I	16195,2	<b>144,3</b>	67,3	<b>72,2</b>	431,2	6185,7
	IL-4 Knockout	8	P+I	14827,4	<b>0,0</b>	50,3	<b>33,5</b>	354,0	4480,4
2000/11	C57Bl/6	3	ConA	<b>628,6</b>	<b>45,2</b>	70,8	179,0	84,8	1220,6
	IL-4 Knockout	6	ConA	<b>1956,1</b>	<b>0,0</b>	16,4	<b>220,5</b>	43,4	289,8
2003/6	C57Bl/6	5	ConA	<b>261,1</b>	<b>7,2</b>	36,8	164,5	55,9	1762,1
	IL-4 Knockout	9	ConA	<b>595,1</b>	<b>0,0</b>	2,3	<b>189,1</b>	47,9	1490,6
2004/22	C57Bl/6	4	ConA	<b>189,8</b>	<b>65,0</b>	6,3	18,5	41,5	1433,7
	IL-4 Knockout	8	ConA	<b>699,2</b>	<b>0,0</b>	5,2	1,7	22,5	906,7
2000/11	C57Bl/6	3	mBSA	111,2	<b>3,9</b>	<b>36,0</b>	12,4	143,6	206,2
	IL-4 Knockout	6	mBSA	177,0	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>18,1</b>	80,6	<b>1799,3</b>
2003/6	C57Bl/6	5	mBSA	166,4	0,0	0,0	25,3	0,0	53,4
	IL-4 Knockout	9	mBSA	<b>320,0</b>	0,0	0,0	<b>3,4</b>	0,0	<b>162,0</b>
2004/22	C57Bl/6	4	mBSA	155,9	0,0	4,5	0,0	37,9	0,0
	IL-4 Knockout	8	mBSA	<b>277,1</b>	0,0	<b>0,0</b>	0,0	<b>10,3</b>	0,0

Nach P+I-Stimulation der Milzzellen sind bei der KO-Maus geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel nachweisbar. Nach ConA-Stimulation zeigen sich wie bei den LK-Zellen höhere IL-2-Spiegel der KO-Maus. Die Zytokine sind in pg/ml angegeben. Signifikante Unterschiede wurden fett gedruckt. Niedrigere Werte der IL-4-KO-Mäuse wurden gelb, höhere Werte rot hinterlegt.

#### 4.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Zytokine

Zum Zeitpunkt der Induktion (0 Tage AIA) hatten die IL-4-KO-Mäuse in den Milzzellen nach P+I- und ConA-Stimulation höhere IL-2-Spiegel. Deutlicher wurde dies an Tag 8, an dem nach allen Stimulationen die IL-2-Spiegel in Lymphknoten- und Milzzellen der IL-4-KO-Mäuse höher waren als bei Wildtyp. An Tag 21 setzte sich diese Erhöhung des IL-2-Spiegels bei den IL-4-KO-Mäusen nach ConA- und mBSA-Stimulation fort.

Der IFN- $\gamma$ -Spiegel der IL-4-KO-Mäuse lag mit Ausnahme der mBSA-Stimulation der LK-Zellen an Tag 3, Tag 8 und Tag 21 und der ConA-Stimulation der LK-Zellen an Tag 3 z.T. signifikant unter dem Wildtyp. Die Spiegel der TH2-Zytokine waren bei beiden Gruppen gering, wobei die IL-4-KO-Maus meist unter dem Wildtyp lag. IL-4 war erwartungsgemäß bei den IL-4-KO-Mäusen nicht nachweisbar.

## 5. Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis ist eine systemische Bindegewebserkrankung, deren Auslöser unbekannt ist und die Mechanismen der Immunpathogenese bisher nur unvollkommen geklärt sind.

In vielen Studien konnte eine T-Zell-Abhängigkeit der immunologischen Abläufe nachgewiesen werden, bei denen T-Zellen als Effektoren und Regulatoren der Immunantwort fungieren (Petrov, Bräuer 1997).

Zur Erforschung und Beschreibung der klinischen und immunologischen Abläufe bei der RA wurde in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl unterschiedlicher Tiermodelle entwickelt. Die AIA zeichnet sich als Modell der RA durch die Ähnlichkeit im histologischen Bild und dem festen zeitlichen Verlauf mit der Möglichkeit der Induktion einer Exazerbation aus. Das Ansprechen auf therapeutische Eingriffe in den Verlauf der Krankheit ist bei der RA und AIA ebenfalls gut vergleichbar (Bendele et al. 1999).

Die bei der AIA eingesetzten C57BL/6-Mäuse reagieren bevorzugt mit einer TH1-Immunantwort, was sie für Autoimmunerkrankungen prädisponiert (Ahmed, 1994). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die TH1-Immunantwort mit ihren Zytokinen maßgeblich an der Entstehung und Chronifizierung der RA beteiligt ist (Isomaki et al. 1996) und TH2-Aktivität mildere Verläufe begünstigt (Yoshino, Yoshino 1998). Bei Balb/c-Mäusen konnte in der CIA eine TH2-Dominanz in der chronischen Phase gezeigt werden, die die Entwicklung einer chronischen Entzündung signifikant verminderte (Mussener et al. 1997).

IL-4 als charakteristisches Zytokin der TH2-Immunantwort ist mit der TH1-Immunantwort in einem System wechselseitiger Hemmung untrennbar verbunden. In einigen tierexperimentellen Studien konnte nach IL-4-Injektion bzw. einer Verschiebung der TH1/TH2-Balance zugunsten von TH2 ein deutlicher Rückgang der entzündlichen Aktivität und der Anzahl betroffener Gelenke verzeichnet werden (Horsfall et al. 1997; Finnegan et al. 1999; Tarner et al. 2002). Im Widerspruch hierzu waren Therapieversuche mit IL-4 beim Menschen und bei der CIA ohne nachweisbaren Effekt (Joosten et al. 1997; van Bosch et al. 1998).

Hieraus ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

1. Wie verändert das Fehlen von IL-4 den klinischen Verlauf der AIA? Gibt es Unterschiede in den klinischen Verläufen der akuten und chronischen Phase? Kann anhand der DTH-Reaktion bei fehlender Hemmung durch IL-4 eine verstärkte zelluläre Immunität nachgewiesen werden?
2. Unterscheidet sich das histologische Bild in den einzelnen Phasen der Entzündung? Führt der IL-4-Mangel zu einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion und Destruktion?
3. Bestehen Unterschiede in Konzentration und Isotypen unspezifischer und antigenspezifischer Immunglobuline?
4. Kann die unterstellte Prädominanz der TH1-Antwort auf Zytokinebene nachgewiesen werden oder kommt es zu einer kompensatorischen Hochregulation anderer TH2-Zytokine?

### **5.1 Klinischer Verlauf (Gelenkschwellung und Gewicht)**

Der Verlauf der Gelenkschwellung war in fast allen Studien bei der Wildttyp-Maus und der Knockout-Maus vergleichbar. Ein bis drei Tage nach Induktion der Arthritis wurde die maximale Gelenkschwellung bei beiden Gruppen erreicht, die bis zum Tag 8 wieder deutlich absank und dann bis zum Tag 21 am Ausgangsniveau ankam.

Diese Ergebnisse decken sich mit Daten aus unserer Arbeitsgruppe (Lehmann 2002) und Ergebnissen bei der CIA in IL-4-defizienten Mäusen (Svensson et al. 2002). Nur in einer Studie zeigten die IL-4-Knockout-Mäuse eine signifikant stärkere Schwellung nach 3 Tagen. Das Körpergewicht der beiden Stämme war in keiner Studie signifikant verschieden. In Studien, bei denen männliche und weibliche Mäuse zum Einsatz kamen, waren die Männchen deutlich schwerer, wobei auch hier kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen feststellbar war.

Insgesamt zeigen unsere Studien, dass der klinische Verlauf einer AIA durch den kompletten Mangel an IL-4 nicht signifikant beeinflusst wird.

## 5.2 Histologie der Kniegelenke

IL-4 ist das charakteristische Zytokin der TH2-Zellen, kann aber auch in humanen Chondrozyten nachgewiesen werden. IL-4 ist notwendig für die Hyperpolarisation der Chondrozyten als Reaktion auf mechanische Belastung. Die mechanische Belastung wird über transmembrane Mechanorezeptoren, das Aktin-Skelett, dehnungsaktivierte Ionenkanäle und durch Aktivierung einer Tyrosin-Kinase übertragen und führt zur Freisetzung von IL-4 (Millward-Sadler et al. 1999). Normaler Knorpel produziert IL-4, das chondroprotektiv wirkt. In Studien konnte gezeigt werden, dass IL-4 die IL-1-induzierte Produktion von MMP1 und MMP3 in Chondrozyten inhibieren kann. Über IL-4 kann die Höhe der mRNA-Level von Molekülen, die für die Erhaltung der Homöostase im Knorpel notwendig sind, gesteuert werden (Nemoto et al. 1997). Ähnliche Befunde erhoben Chowdhury et al., als sie nachwiesen, dass durch IL-4 die Knorpeldestruktion durch IL-1 $\beta$ , Prostaglandin E2 und NO vermindert werden kann (Chowdhury et al. 2006).

Schuerwegh et al. (2003) zeigten, dass bovine Chondrozyten nach Inkubation mit IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  deutlich kürzer lebten und dass IL-1 $\alpha$  dosisabhängig und TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bei 100ng/ml die NO-Produktion der Chondrozyten induzieren. Nach Inkubation der Chondrozyten mit IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  kam es zu einem Anstieg der Apoptoserate. Durch IL-4 wurde dieser Effekt verhindert. Durch Prä-Inkubation der Chondrozyten mit IL-4 wurde die IL-1 $\alpha$ -/TNF- $\alpha$ -induzierte NO-Produktion reduziert und eine Zunahme der Chondrozytenproliferation erreicht.

Nach diesen Daten wäre in einem IL-4-Knockoutmodell, nach Wegfall eines chondroprotektiven Zytokins, eine Zunahme der Knorpeldestruktion zu erwarten.

Verhoef et al. konnten aber in Chondrozyten von RA-Patienten keinen Zusammenhang zwischen der Gelenkdestruktion und dem IL-4-Spiegel sehen. Ein protektiver Effekt wurde aber für IL-10 vermutet (Verhoef et al. 2001).

In einer anderen Studie bestand in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten ein Überwiegen der TH1-Zytokine, ohne nachweisbares IL-4 (Dolhain et al. 1996).

In einer früheren AIA-Zeitstudie aus unserer Arbeitsgruppe mit IL-4-Knockout-Mäusen war zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in den histologischen Befunden im Vergleich mit dem Wildtyp zu verzeichnen (Lehmann 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den histologischen Befunden in den meisten Studien bei keiner Zeitstufe ein signifikanter Unterschied zwischen IL-4-Knockout und Wildtyp-Mäusen gesehen werden. Dies scheint zum oben postulierten protektiven Effekt von IL-4 auf

Chondrozyten und der zu erwartenden Zunahme der Destruktion nach Wegfall des IL-4 im Widerspruch zu stehen, muss aber vor dem Hintergrund einer bereits durch die Immunisierung bestehenden TH1-Polarisierung des Versuches und der wahrscheinlich auch beim Wildtyp nur sehr geringen IL-4-Titer in der Synovia gesehen werden. Wie bereits von Stamp et al. (2004) beschrieben, ist die Knorpeldestruktion bei der Arthritis wesentlich von der IL-17-induzierten Aktivität von MMPs und der erhöhten Osteoklastenaktivität getragen. Die in einer Studie nachgewiesene stärkere akute Entzündung und schwerere Destruktion in der chronischen Phase hätte die Erwartung bestärkt, war aber nicht reproduzierbar. Unsere histologischen Untersuchungen haben damit die klinischen Befunde bestätigt, dass der IL-4-Mangel keinen Einfluss auf die AIA hat.

### 5.3 DTH-Reaktion

Die DTH (delayed-type hypersensitivity)-Reaktion ist eine Immunreaktion vom Typ IV und dient der In-vivo-Bestimmung der zellulären Immunität.

Cher und Mosmann wiesen nach, dass nach lokaler Injektion von TH1-Zellen aus mit Antigen immunisierten Mäusen in naiven Mäusen eine MHC-restringierte, antigenspezifische DTH-Reaktion ausgelöst werden konnte. Die Injektion von TH2-Zellen oder zytotoxischen T-Zellen mit dem Antigen führten zu keiner Reaktion. Hieraus wurde geschlossen, dass die DTH-Reaktion primär TH1-abhängig ist (Cher, Mosmann 1987). Nach intravenöser Injektion der immunen TH1-Zellen kam es zu keiner DTH-Reaktion. Dieli et al. (1994) züchteten durch wiederholte Stimulation in vitro Hapten(trinitrophenyl)-spezifische T-Zellen aus Lymphknotenzellen, die von ihrem Zytokinmuster TH1-Zellen entsprachen. Nach lokaler Injektion dieser Zellen mit dem Antigen konnte eine DTH-Reaktion induziert werden. Nach Vorbehandlung der Empfängermaus oder Inkubation der Zellen mit IL-4 war es möglich, eine DTH-Reaktion auch nach intravenöser Gabe der Zellen auszulösen und einen systemischen Transfer zu erreichen. Die Möglichkeit eines systemischen Transfers der DTH nach IL-4-Gabe beruht wahrscheinlich auf einer chemotaktischen Wirkung von IL-4. Dies bewirkt eine Steigerung des Monozyten-chemotaktischen Proteins, wodurch nach lokaler Antigeninjektion die Zellmigration zum Ort des Geschehens begünstigt wird. Des Weiteren konnte durch IL-4 eine Steigerung der Leukozytenadhäsion an Gefäßwänden nachgewiesen werden (Masinovsky et al. 1990; Elfaki et al. 1994; Luscinskas et al. 1994). Ähnliches beschrieben Huang et al. (2007) bei der Untersuchung der Migration von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe bei einer allergischen Reaktion. IL-4 steigerte die Expression von

Chemokinen und Adhäsionsmolekülen des Endothels der Lungenkapillaren und steigerte die Wirkung von bakteriellen Lipopolysacchariden.

Nach Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-4 wurde in immunisierten Mäusen das Auftreten der DTH-Reaktion nach Antigen-Injektion um 75% reduziert, was für eine wichtige Rolle von IL-4 in der Effektorphase der DTH-Reaktion spricht (Salerno et al. 1995).

Akahira-Azuma et al. (2004) konnten eine Beteiligung von TH1- und TH2-Zytokinen an der DTH-Reaktion in verschiedenen Mausstämmen (u.a. C57Bl/6) und nach unterschiedlichen Immunisierungen nachweisen. Aufgrund des Zytokinschemas mit IL-4, IL-5 und IFN- $\gamma$  und der geringen gegenseitigen Inhibition wurde als Quelle der Zytokine ein noch nicht polarisierter Zelltyp, die TH0-Zelle vermutet.

Hieraus folgt, dass eine ausschließliche Abhängigkeit der DTH-Reaktion von TH1-Zytokinen stark anzuzweifeln ist. Dieser Zweifel ist, wie sich anhand der Forschung der letzten Jahre und des zunehmenden Wissens über die proinflammatorische Wirkung von IL-17 gezeigt hat, berechtigt (Alber, Kamradt 2007).

Der anhand der DTH-Reaktion bestimmte fehlende Unterschied bei der zellulären Immunität zeigt, dass der bisher angenommene alleinige Einfluss der TH1-Zytokine auf diese Reaktion nicht haltbar ist. In einigen Studien konnte, über eine Steigerung der Chemotaxis und Leukozytenadhäsion, für IL-4 eine wichtige Funktion in der Effektorphase der DTH-Reaktion nachgewiesen werden. Auch ist der Rückschluss vom IFN- $\gamma$ -Spiegel auf die Ausprägung der DTH-Reaktion vor dem Hintergrund des aktuellen Wissens nicht mehr zulässig. In den letzten Jahren wurde in vielen Studien IL-17 als maßgeblicher Träger von proinflammatorischen Effekten bei Immunreaktionen gesehen (Alber, Kamradt 2007).

In dieser Arbeit konnte zwischen den beiden Mausstämmen bei der DTH-Reaktion außer in einer Studie kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Als ursächlich für die fehlenden Unterschiede zwischen den Mausstämmen sind die starke TH1-Polarisierung nach der Immunisierung und die auch im Wildtyp sehr geringen IL-4-Spiegel anzusehen. Einige Studien konnten sogar zeigen, dass IL-4 keineswegs die DTH-Reaktion unterdrückt, sondern durchaus, wahrscheinlich über eine Steigerung der Chemotaxis und der Leukozytenadhäsion, einen fördernden Einfluss haben kann. Daher ist zu diskutieren, ob die zu erwartende Verstärkung der DTH-Reaktion nach Wegfall von IL-4 nicht durch eine gleichzeitige Schwächung weiterer an der Reaktion beteiligter Prozesse (Chemotaxis, Adhäsion) aufgehoben wird. Nach meinen Befunden muss für die TH1- und TH2-Zellen auch eher ein

DTH-modulierender Effekt angenommen werden, da die TH17-Zelle wesentlicher Träger der zellulären Immunreaktion ist.

## 5.4 Serumantikörper

Der Immunglobulin-Klassenwechsel ist ein komplexer Prozess, der von TH1- und TH2-Zytokinen beeinflusst wird. Die maßgeblich beteiligten Zytokine sind IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ . Durch IL-4 wird in murinen B-Zellen die Produktion von IgG1 und IgE und in humanen B-Zellen die Produktion von IgG4 und IgE gefördert. Für die Induktion des Klassenwechsels reicht eine alleinige Stimulation durch IL-4 nicht aus. Es ist ein zweites Signal notwendig, das über den Kontakt zu aktivierten T-Zellen und CD40 oder bei murinen B-Zellen über IL-5 erfolgen kann (Purkerson, Isakson 1991). Nach Stimulation von B-Lymphoblasten mit LPS und IL-4 konnte eine deutliche Steigerung der Expression von membrangebundenem IgG1 nachgewiesen werden. Zur Stimulation der Sekretion von IgG1 war ein zusätzlicher Reiz mit IL-2 und IL-5 notwendig (Purkerson, Isakson 1991).

Die IL-4-induzierte Produktion bestimmter Immunglobulin-Subklassen ist neben den stimulierenden Zytokinen auch vom genetischen Hintergrund der Mausstämme und einer damit verbundenen Varianz in Funktion und Phänotyp der B-Zelle verbunden. Gezeigt wurde dies an 3 Mausstämmen, der Swiss James Lambert (SJL)-, der 129/Sv- und der C57Bl/6-Maus (Kaminski, Stavnezer 2007). Zusätzlichen Einfluss auf den Wechsel der Immunglobulin-Isotype hat das Alter. Mit zunehmendem Alter wird die Anzahl unterschiedlicher Isotypen geringer (Frasca et al. 2007).

IFN- $\gamma$  kann den Wechsel zu IgE und IgG1 unterdrücken und fördert die Produktion von IgG2a, wobei die Unterdrückung der IgG1-Bildung auf das polyklonale IgG1 beschränkt und bei antigenspezifischem IgG1 nur gering ausgeprägt ist. Durch Finkelmann et al. (1990) wurde eine In-vivo-Bedeutung des IL-4 für den Wechsel zu IgG1 angezweifelt (Snapper et al. 1988; Finkelmann et al. 1990). IL-4 kann die IFN- $\gamma$ -induzierte Bildung von IgG2a unterdrücken (Snapper und Paul 1987).

Snapper und Mond postulierten einen zusätzlichen Stimulus für den Immunglobulin-Klassenwechsel durch Makrophagen, natürliche Killerzellen und polyklonal aktivierte B-Zellen (Snapper, Mond 1993).

IL-4 als maßgebliches Zytokin des Wechsels der Immunglobulin-Isotypen zu IgG1 und IgE mit gleichzeitiger Hemmung der IFN- $\gamma$ -induzierten IgG2a-Bildung scheint nicht unersetzbar.



Durch Cocks et al. konnte nachgewiesen werden, dass auch nach Blockierung von IL-4 durch IL-13 in Verbindung mit CD40L die B-Zell-Differenzierung stimuliert und der Klassenwechsel zu IgE erfolgen kann (Cocks et al. 1993).

IL-13 und IL-4 zeigen an B-Zellen eine ähnliche Wirkung, aber für IL-13 scheint ein Einfluss auf den Immunglobulin-Klassenwechsel nur unter bestimmten Vorraussetzungen gegeben. Nach Hinzugabe von IL-13 bei der Immunisierung von BALB/c-Mäusen konnten deutlich höhere Plasmaspiegel für die Gesamttiter von IgG1, IgG2a und IgG2b und der antigenspezifischen Immunglobuline bestimmt werden. Außerdem war die Anzahl und Überlebenszeit der B-Zelle nach IL-13-Gabe deutlich höher (Lai, Mosmann, 1999) .

Im Modell der Proteoglykan-induzierten Arthritis, das hohe IFN- $\gamma$ -Spiegel zeigt und daher den TH1-gewichteten Modellen zugeordnet wird, wurde von Kaplan et al. der Zusammenhang zwischen TH1-/TH2-Zytokinen und der Ausbildung Proteoglykan-spezifischer Antikörper untersucht. Trotz der angenommenen TH1-Gewichtung reagierten die Tiere nach Immunisierung mit einer deutlich stärkeren IgG1-Bildung bei gleichzeitig erhöhten IFN- $\gamma$ -Spiegeln. Dieser scheinbare Widerspruch wurde auf die zusätzliche Abhängigkeit von der Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Aktivierung der B-Zellen über CD40 zurückgeführt. Bei IL-4-defizienten Mäusen wurde eine geringe Reduktion des antigenspezifischen IgG1 bei stark erhöhtem IgG2a nachgewiesen. Dies spricht für eine suppressive Wirkung von IL-4 auf IgG2a, lässt aber die große Bedeutung von IL-4 für die Bildung einer antigenspezifischen IgG1-Antwort fraglich erscheinen. Interessanterweise bestand in IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen ein reduzierter IgG2a-Spiegel bei unverändertem IgG1. Bei den IL-4-defizienten Mäusen konnte mit dem erhöhten IgG2a auch eine deutliche Zunahme der Schwere der Arthritis gesehen werden (Kaplan et al. 2002).

TH1-Zellen sind für die zelluläre Immunität verantwortlich, wohingegen TH2-Zellen vorwiegend über humorale Mechanismen immunologisch wirksam sind. Der geringere Einfluss von TH1-Zytokinen auf die Ausbildung von Antikörperklassen kann durch IL-12 gesteigert werden. Nach Gabe von IL-12 mit einem Proteinantigen konnte ein deutlicher Anstieg von IgG2a, IgG2b und IgG3 bei nur gering gesteigerter IgG1-Synthese und supprimierter IgE-Bildung gesehen werden. Der steigernde Effekt von IL-12 wurde durch Antikörper gegen IFN- $\gamma$  behindert. Diese Ergebnisse scheinen eine TH1-Polarisierung auf Immunglobulinebene unter IL-12-Einfluss darzustellen (Germann et al. 1995).

Bei der CIA in IL-4-defizienten Mäusen war nach Immunisierung mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) eine Reduktion des antigenspezifischen IgG1 mit hohen antigenspezifischen IgG3-Titern festzustellen. Nach Immunisierung mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA), wodurch eine starke TH1-Polarisierung vermieden werden soll, zeigten die Knockout-Mäuse eine deutliche Reduktion der antigenspezifischen IgG1- und IgG2b-Titer. Interessanterweise hatten die IFA-immunisierten Mäuse eine geringere akute Entzündung, aber rezidivierende Entzündungsschübe in der chronischen Phase der CIA (Svensson et al. 2002).

Kuhn et al. generierten eine IL-4-defiziente Maus auf dem C57BL/6-Hintergrund und charakterisierten das Immunsystem im Vergleich zum Wildtyp. Die T-Zell-Subklassen waren bei beiden Gruppen vergleichbar, ebenso die Zellzahlen. Die einzige Ausnahme war, dass die Knockout-Maus im Alter von 6 Wochen doppelt so viele Thymozyten hatte. Bei den Antikörper-Isotypen hatte die Knockout-Maus einen auf 1/6 reduzierten IgG1-Spiegel und meist kein nachweisbares IgE. Die Spiegel von IgM, IgG2a, IgG2b und IgA waren bei beiden Gruppen identisch. Nach Immunisierung mit Hühner- $\gamma$ -Globulin war im Vergleich zum Wildtyp der antigenspezifische-IgG1-Spiegel auf 1/2 bis 1/3 reduziert, die spezifischen IgG2a und IgG2b-Spiegel um das 10-20fache und die IgG3-Spiegel auf das 3fache erhöht. Zusammenfassend war die IL-4-defiziente Maus in der Entwicklung der B- und T-Zellen nicht beeinträchtigt (Kuhn et al. 1991).

In unseren Untersuchungen waren die IgG1-Spiegel, wie erwartet, sowohl insgesamt als auch antigenspezifisch zu allen Zeitstufen bei der IL-4-Knockout-Maus deutlich reduziert, was die Bedeutung von IL-4 für den Subklassenwechsel unterstreicht. Aber gleichzeitig wird dies wegen des deutlich noch nachweisbaren IgG1-Spiegel relativiert. Neben IL-4 existieren noch andere Wege, die Produktion von IgG1 zu induzieren, z.B. durch IL-5 oder IL-13. Bereits durch Finkelmann et al. (1990) wurde die große Bedeutung von IL-4 für die Bildung von IgG1 in vivo angezweifelt.

Zum Zeitpunkt der Induktion (Tag 0) und zum Zeitpunkt 3 Tage AIA hatten die IL-4-KO-Mäuse z.T. signifikant höhere Spiegel von mBSA-spezifischem IgG2a und IgG2b und an Tag 3 zusätzlich tendenziell höhere Spiegel des unspezifischen IgG2b und IgG3 und mBSA-spezifischen IgG3. Dies unterstreicht die fehlende Hemmung der Ausbildung von TH1-typischen Immunglobulinen durch IL-4 und ist ein Hinweis auf eine Verschiebung der Balance zugunsten einer TH1-Antwort (Snapper und Paul 1987).

Nach 3 Tagen AIA-Dauer waren bei der Knockout-Maus deutlich geringere IgG1-Spiegel reproduzierbar. Ebenso zeigte sich nach 8 Tagen AIA-Dauer ein verminderter IgG1-Titer, ansonsten jedoch bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Nach 21 Tagen war neben dem signifikant verminderten IgG1 in allen Studien bei der IL-4-defizienten Maus eine Reduktion der unspezifischen Immunglobuline nachweisbar.

Als ursächlich für die tendenzielle TH1-Polarisierung ist der meist verminderte IFN- $\gamma$ -Spiegel der IL-4-KO-Mäuse und die mögliche Kompensation des IL-4-Mangels durch IL-13 zu diskutieren.

## 5.5 Zytokine

Zytokine sind die Regulatoren des Immunsystems, die von unterschiedlichen Zellen des Immun- und hämatopoetischen Systems und von verschiedenen Geweben produziert werden. Sie bilden ein komplexes Netzwerk gegenseitiger Beeinflussung.

In dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung der Immunreaktion auf einige Zytokine zurückgegriffen, die der Übersicht wegen und in Anlehnung an die Einteilung von Mosmann 1986 in TH1- und TH2-typische Zytokine unterteilt wurden. Für einige der Zytokine, wie z.B. IL-6 ist diese Einteilung nicht ganz korrekt, da IL-6 nicht hauptsächlich ein Produkt der TH2-Zelle ist, sondern vielmehr von Monozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten produziert wird.

Die TH1-Zelle, als Trägerin der zellulären Immunreaktion, lässt sich über ihre charakteristischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  beschreiben. Bei der TH2-Zelle wird die humorale Immunität v.a. über IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 vermittelt (Cher, Mosmann 1987; Mosmann et al. 1986, 1989; Bottomly 1988; Schmitt et al. 1991; Mosmann, Sad 1996).

Naive CD4<sup>+</sup>T-Zellen (precursor cells THp) produzieren nach Stimulation vor allem IL-2. In Anwesenheit von IL-4 differenzieren sich naive CD4<sup>+</sup>T-Zellen zu TH2-Zellen. Bei fehlendem IL-4 und besonders bei gleichzeitig anwesendem IL-12 erfolgt die Differenzierung zu IFN- $\gamma$ -produzierenden TH1-Zellen. Dieser Prozess wird von IL-4 inhibiert (Seder, Paul 1994).

TGF- $\beta$  allein aktiviert die Ausbildung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und in Kombination mit IL-6 wird die Bildung von TH17-Zellen gefördert (Afzali et al. 2007).

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das von Phagozyten und anderen Antigen-präsentierenden Zellen (Antigen-presenting cells APC) nach Aktivierung produziert wird. Durch IL-12 wird besonders in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  die Differenzierung der THp-Zellen zu TH1-Zellen gefördert. Die T-Zell-abhängige Aktivierung der APC erfolgt durch Interaktion des CD40-Liganden (CD40L, CD154) auf aktivierten T-Zellen mit dem CD40-Molekül auf B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen (van Kooten, Banchereau 2000).

IL-4 und IL-13 sind charakteristische TH2-Zytokine mit vielen gemeinsamen Funktionen bei der TH2-Differenzierung und ihren antiinflammatorischen Eigenschaften. IL-4 kann über einen STAT6-abhängigen Prozess die Differenzierung von THp-Zellen zu TH2-Zellen induzieren und bewirkt einen Wechsel der Immunglobulin-Isotypen zu IgG1 und IgE (Abbas et al. 1996). IL-4 und IL-13 entfalten ihre antiinflammatorische Wirkung u.a. durch das Herunterregulieren proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und haematopoetischer Wachstumsfaktoren von LPS (Lipopolysaccharid)-stimulierten Monozyten und Makrophagen. In Kurzzeitkulturen konnte durch IL-4 und IL-13 eine Hemmung von IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 (p35 und p40), IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF und anderer Mediatoren gezeigt werden, bei gleichzeitiger Aktivierung des IL-1Ra (Rezeptor-Antagonist) (Minty et al. 1993; Zurawski et al. 1994; D'Andrea et al. 1995).

Interessanterweise nutzen die TH2-Zellen auch den CD40-Liganden für die Interaktion mit den B-Zellen und produzieren antiinflammatorische Zytokine. Bullens et al. konnten zeigen, dass der inhibitorische Effekt der TH2-Zelle nach LPS-Stimulation der Monozyten eintritt. Nach Stimulation der Monozyten durch T-Zellen und CD40L mit IFN- $\gamma$  konnte für IL-4 und IL-13 eine Verstärkung dieser Aktivierung mit gesteigerter IL-12-Synthese gezeigt werden. Somit können auf dieser Ebene IL-4 und IL-13 zu einer TH1-Polarisierung führen (Bullens et al. 2001). Diese Daten decken sich mit der Beobachtung, dass es in Kokulturen aus TH2-Klonen und dendritischen Zellen zu einer gesteigerten Bildung von IL12p70 und somit zu einem Wechsel zum TH1-Phänotyp kommt. Als Zweck dieses Systems wird eine Eindämmung überschießender allergischer Reaktionen und die Stärkung der zellvermittelten Immunität bei Autoimmunerkrankungen oder chronischen Entzündungen vermutet (Kalinski et al. 2000).

Ähnliche Beobachtungen machten Mencacci et al. bei der *Candida albicans*-Infektion in IL-4-defizienten Mäusen. Die IL-4-defizienten Mäuse zeigten nur eine geringe IL-12-Produktion

und eine geringe TH1-Reaktion. Sie verstarben im Laufe der Infektion. Durch die Anwesenheit von IL-4 wurde die TH1-Antwort verstärkt (Mencacci et al. 1998).

Diese Daten zeigen, dass die strenge Trennung zwischen TH1- und TH2-Phänotyp und die Theorie gegenseitiger Hemmung durchaus Ausnahmen hat. Durch TH2-Reaktionen kann eine TH1-Antwort verstärkt werden. Sinn dieses Systems ist wahrscheinlich die Vermeidung überschießender Reaktionen einer TH-Subpopulation.

Viele Jahre galt IFN- $\gamma$  als wesentlicher Faktor für die Entzündungsreaktion bei Autoimmun-Prozessen. Im Widerspruch hierzu zeigten Irmeler et al. (2007), dass die AIA in IFN- $\gamma$ -defizienten Mäusen IL-17-abhängig schwerer verläuft und dass diese Aggravation durch die Neutralisation von IL-17 vermindert werden kann. IFN- $\gamma$  wirkte in der Initialphase der AIA durch die Hemmung von IL-17 antiinflammatorisch (Irmeler et al. 2007). Ähnliche Beobachtungen beschrieben Langrish et al. (2005) und Chen et al. (2006) im Tiermodell der EAE.

Die CIA kann normalerweise nur in suszeptiblen Mausstämmen ausgelöst werden. Als Prototyp der CIA-suszeptiblen Mausstämme gilt die DBA/1-Maus. Die C57Bl/6-Maus entwickelt in diesem Modell nach der Immunisierung keine Arthritis. Chu et al. (2007) untersuchten dieses Phänomen und fanden in der DBA/1-Maus im Vergleich zur C57Bl/6-Maus geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel bei höheren IL-17-Spiegeln als mögliche Erklärung. Nach Knockout von IFN- $\gamma$  bei der C57Bl/6-Maus konnte auch in diesem Stamm eine CIA ausgelöst werden, vergesellschaftet mit deutlich höheren IL-17-Spiegeln. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche Neutralisation von IL-4 noch verstärkt werden (Chu et al. 2007).

Bei IL-4-defizienten Mäusen war aufgrund der fehlenden TH2-Polarisierung der THp-Zellen durch IL-4 eine verminderte Produktion anderer TH2-Zytokine wie IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und IL-10 feststellbar (Kopf et al. 1993, 1995).

In einigen Infektionsstudien konnte trotz fehlendem IL-4 ein Restspiegel von TH2-Zytokinen gemessen werden. Als Begründung hierfür wurde von Assenmacher et al. (1994) und Bucy et al. (1994) das Vorhandensein kleiner, IL-4-unabhängiger T-Zell-Untergruppen bzw. die individuelle, unabhängige Zytokinproduktion innerhalb eines Phänotyps diskutiert.

Jacobs et al. führten 1994 Untersuchungen zum Einfluss von IL-2 und IL-4 auf die Flare-up-Reaktion bei der AIA durch. IL-2 wird meist einer TH1-Polarisierung der Immunantwort zugeordnet, wohingegen IL-4 als das typische Zytokin einer TH2-Antwort gilt. Nach Behandlung mit anti-IL-2-Antikörpern kam es in dieser Studie zu einer geringeren

Ausprägung der Flare-up-Reaktion, was in das Bild einer geschwächten TH1-Polarisierung dieses Modells gut einzuordnen ist. Überraschenderweise konnte durch Gabe von IL-4-eliminierenden Antikörpern die Flare-up-Reaktion noch effizienter blockiert werden. Nach zusätzlicher Injektion von IL-2 oder IL-4 führten beide Zytokine zu einer deutlichen Verstärkung der Flare-up-Reaktion, wobei IL-2 potenter war. IL-4 kann also in der chronischen Phase der AIA und besonders bei der Flare-up-Reaktion durchaus proinflammatorische Qualitäten haben (Jacobs et al. 1994). Möglicherweise liegt dieser Beobachtung die fördernde Wirkung von IL-4 auf die Leukozyten-Chemotaxis und Adhäsionsprozesse am Endothel zugrunde.

Im Modell der Kollagen-Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA) entwickelten IL-4-defiziente Mäuse mit geringerer Inzidenz eine Arthritis. Ebenso konnte durch Depletion von IL-4 die CAIA unterdrückt werden (Nandakumar und Holmdahl 2006).

Fraglich bleibt, ob unterschiedliche experimentelle Arthritismodelle direkt miteinander vergleichbar sind, da durch die abweichenden Immunisierungsschemata eine z.T. ausgeprägte Polarisation der Immunantwort in Richtung eines TH-Subtypes erfolgt. Schon durch die Gabe von komplettem Freund'schen Adjuvans wird eine Verstärkung der TH1-Antwort bewirkt.

Aufgrund der geringen Spiegel an T-Zell-typischen Zytokinen im Gelenk bei der RA, trotz hoher T-Zell-Zahlen im Gelenkspalt, wurde von einigen Autoren die Rolle der T-Zelle in der Pathogenese der RA generell angezweifelt. Es wurde eine T-Zell-unabhängige Aktivierung der Monozyten und Makrophagen bei der RA vermutet. Mit zunehmendem Wissen über die Funktion des von T-Zellen gebildeten IL-17 wurde dieser Zweifel beseitigt. IL-17 wirkt bei der Entwicklung der RA direkt proinflammatorisch und kann die Wirkung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  verstärken. Die Knorpeldestruktion wird von IL-17 durch die Induktion von MMPs und Osteoklasten beschleunigt (Stamp et al. 2004).

In dieser Arbeit hatten die Knockout-Mäuse zum Zeitpunkt der Induktion geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel, was unerwartet war und sich schlecht in das Konzept der TH1-Polarisierung beim IL-4-Knockout einfügen lässt. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde ist, dass IFN- $\gamma$  auch von anderen Zell-Typen produziert wird. Togashi et al. (2007) untersuchten die Bildung von IFN- $\gamma$  durch natürliche Killer-T-Zellen (natural killer T-cells NKT) in IL-4-Knockout-Mäusen auf dem C57Bl/6-Hintergrund nach Stimulation mit Galactosylceramid. Nach der ersten

Stimulation hatten die NKT der Knockout-Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp kein IFN- $\gamma$  produziert. Diese Beobachtung war nicht auf eine generell defizitäre IFN- $\gamma$ -Produktion der IL-4-defizienten-NKT zurückzuführen, da nach einer zweiten, längeren Stimulation IFN- $\gamma$  in der Kultur nachweisbar war. Nach Kokultur der IL-4-defizienten-NKT mit dendritischen Zellen blieb die beim Wildtyp nachgewiesene IFN- $\gamma$ -Produktion ebenso aus (Togashi et al. 2007).

Bei insgesamt niedrigen TH2-Zytokinspiegeln lag die Knockout-Maus zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion bei IL-4, IL-6 und tendenziell bei IL-5 und IL-10 unter dem Wildtyp. In Milzzellen hatte die Knockout-Maus in beiden Studien höhere IL-2-Titer.

In der akuten Entzündungsphase nach 3 Tagen AIA manifestierte sich nach ConA-Stimulation der Milzzellen der signifikant höhere IL-2-Spiegel bei den IL-4-defizienten Mäusen. Die generelle Schwächung der TH2-Zytokine, die bereits Kopf et al. (1995) beschrieben haben, war reproduzierbar.

Nach 8 Tagen AIA-Dauer hatte die Knockout-Maus geringere IFN- $\gamma$ -Spiegel in Milz und Lymphknoten-Zellen und nach P+I- und ConA-Stimulation höhere IL-2-Spiegel. Im klinischen Verlauf, den Antikörper-Titern und der histologischen Ausprägung der AIA zu dieser Zeitstufe konnten keine Auswirkungen dieser unterschiedlichen Spiegel auf die Arthritis nachgewiesen werden.

In der chronischen Phase nach 21 Tagen fanden sich Gruppenunterschiede nach ConA-Stimulation. Die Knockout-Maus hatte weiterhin einen höheren IL-2 Spiegel und bei insgesamt niedrigen Zytokin-Titern eine schwächere Ausprägung der TH2-Antwort.

Auf Zytokinebene stellte sich ein heterogenes Bild der TH1-Polarisierung dar. Einerseits fanden sich bei den IL-4-KO-Mäusen bereits zum Zeitpunkt der Arthritisinduktion in Milzzellen deutlich höhere IL-2-Spiegel. Diese Beobachtung wurde an Tag 8 noch bestärkt, an dem sich in Lymphknoten- und Milzzellen besonders nach ConA-Stimulation signifikant höhere IL-2-Spiegel nachweisen ließen. Andererseits lagen die IFN- $\gamma$ -Spiegel der IL-4-KO-Mäuse meist unter den Wildtyp-Kontrollen. Diese heterogene TH1-Polarisierung auf Zytokinebene ist zu erklären, wenn man sich von der sehr vereinfachten Vorstellung des „guten“, antiinflammatorisch wirksamen Antagonismus des IL-4 verabschiedet.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass IL-4 durchaus eine Polarisierung in Richtung einer TH1-Antwort bewirken kann. Nach Stimulation der phagozytierenden Zellen durch TH2-Zellen über CD40-CD40L (CD154) kam es über eine Zunahme der IL-12-Produktion zu einer Polarisierung zugunsten einer TH1-Antwort. Durch den IL-4-Knockout wird also auch eine

Schwächung der TH1-Antwort induziert, was mutmaßlich den erwarteten TH1-fördernden Einfluss des Knockout relativiert und eine Erklärung für die meist geringeren IFN- $\gamma$ -Spiegel der Knockout-Maus liefert (Bullens et al. 2001).

Trotz der Hinweise auf eine TH1-Polarisierung bei den Immunglobulinen und durch den konstant höheren IL-2-Spiegel der Knockout-Maus scheint eine ausgeprägte Verschiebung der Balance zugunsten von TH1 wegen der nach IL-4-Knockout geschwächten TH1-Strecke auszubleiben.

Eine proinflammatorische Wirkung von IL-4 konnte bereits in Studien im Modell der CIA nachgewiesen werden. Die IL-4-Knockout-Mäuse entwickelten nach Modifikation des Immunisierungsschemas eine deutlich geringere akute Arthritis, die aber im chronischen Verlauf gehäuft wieder aufflammte (Svensson et al. 2002). In einer anderen Studie konnte in der IL-4-Knockout-Maus bzw. nach Neutralisation von IL-4 mit Antikörpern die Penetranz und die Schwere der CIA deutlich gesenkt werden (Ortmann, Shevach 2001).

Die Vorstellung, dass die Hauptfunktion des IL-4 in der TH2-Antwort und dem Antagonismus zur TH1-Antwort besteht ist nicht zu halten. IL-4 hat über die seine Wirkung im TH2-System hinaus viele komplexe Funktionen und Interaktionen, die die Vorstellung des „guten“ IL-4 bei der AIA deutlich verändern. Die vorliegende Arbeit fügt sich mit ihren Ergebnissen in dieses Bild ein.

Auch wurde durch Studien im Modell der AIA, CIA und EAE der letzten Jahre belegt, dass eine TH1-Polarisierung keineswegs zur Zunahme der Entzündungsreaktion in Tiermodellen der RA führt. Vielmehr wurde wiederholt ein antiinflammatorischer Effekt von IFN- $\gamma$  beschrieben. Das wesentliche proinflammatorische Zytokin ist nach dem aktuellen Wissensstand IL-17 (Langrish et al. 2005; Chen et al. 2006; Chu et al. 2007, Irmiler et al. 2007). Im Modell der EAE kam es nach Knockout von IL-23 zu keiner TH17-Antwort und in Folge dessen zu einer Resistenz der Mäuse bezüglich einer EAE (Furuzawa-Carballeda et al. 2007).

Von Alber und Kamradt wurde eine IL-17-Hemmung durch IFN- $\gamma$  und IL-4 beschrieben (Alber, Kamradt 2007). Sarkar et al. wiesen nach, dass die CIA in Inzidenz und Schwere deutlich milder verläuft, wenn genetisch modifizierte dendritische Zellen vermehrt IL-4 produzieren und IL-17 durch den erhöhten IL-4-Spiegel gehemmt wird (Sarkar et al. 2007).

Hier ist wahrscheinlich auch ein möglicher Ansatz für zukünftige Therapiestrategien zu suchen. IL-17 kann die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 induzieren und über eine Steigerung der MMP-Produktion und Osteoklastenaktivität direkt



zur Knorpeldestruktion beitragen. Eine Anti-IL-17-Therapie erscheint ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung der RA oder der Multiplen Sklerose zu sein (Koenders et al. 2006).

## **5.6 Schlussfolgerungen und zukünftige Fragestellungen**

Um den klinischen Verlauf der AIA und die immunologischen Parameter bei der IL-4-Knockout-Maus zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit die Gelenkschwellung, die Histologie, die Gesamt- und antigenspezifischen Antikörper und die Zytokine bestimmt und mit dem Wildtyp verglichen.

Die RA galt bisher als von TH1-Zytokinen unterhaltene Erkrankung, bei der TH2-Zytokine eine antagonistische, antiinflammatorische Wirkung entfalten.

Aufgrund dieser in vielen Studien belegten TH1-Gewichtung der RA bzw. AIA war die Erwartung, dass sich nach Knockout des typischen Zytokins der TH2-Antwort und eliminierter Hemmung der TH1-Zytokine eine deutlich schwerer verlaufende Erkrankung entwickelt. Gleichzeitig waren ausgeprägtere histologische Veränderungen und eine deutliche TH1-Gewichtung auf der Zytokinebene oder bei den Immunglobulinen zu erwarten.

Diese Erwartung wurde nicht bestätigt bzw. zeigte sich nur tendenziell.

Die wahrscheinlichen Ursachen für das Ausbleiben der erwarteten TH1-Übermacht in IL-4-defizienten Mäusen sind vielfältig.

Der in dieser Arbeit verwendete Mausstamm die C57Bl/6-Maus, auf dessen Hintergrund auch der IL-4-Knockout erfolgte, hat eine bereits genetisch determinierte TH1-Polarisierung. Durch das Immunisierungsschema mit Mycobakterien-supplementiertem Freund'schen Adjuvans wird die weitere Verschiebung der Balance zugunsten einer TH1-Antwort gefördert (Stasiuk et al. 1996). Dies kann gut an den in dieser Arbeit schon bei dem Wildtyp nur geringen TH2-Zytokin-Spiegeln nachvollzogen werden. Die generell geringere TH2-Antwort der IL-4-KO-Mäuse, die von Kopf et al. beschrieben wurde, wird somit etwas relativiert (Kopf et al. 1993, 1995).

Trotz der bei den IL-4-Knockout-Mäusen nachgewiesenen tendenziellen TH1-Polarisierung auf Ebene der Immunglobuline und Zytokine kam es nicht zu reproduzierbaren schwereren klinischen Verläufen der AIA und zu keiner Zunahme der histologischen Veränderungen. Als Erklärung dienen hier die anti- und proinflammatorischen Effekte, die über IL-4 vermittelt werden und die Tatsache, dass nach neueren Erkenntnissen die Schwere des Verlaufes der AIA über IL-17 vermittelt wird. IL-4 und IFN- $\gamma$  sind für den Verlauf der RA nicht

bedeutungslos, haben aber eher entzündungsmulierende Effekte in einem komplexen System pro- und antiinflammatorischer Wirkung. Auch können IL-4 und IFN- $\gamma$  in den verschiedenen Phasen der Erkrankung unterschiedliche Effekte haben.

Zum besseren Verständnis der komplexen Pathogenese Prozesse und als Grundlage für ein gezieltes Eingreifen und eine therapeutische Beeinflussung sind u.a. folgende Fragen noch zu beantworten:

1. Welche Rolle spielt IL-17 in der AIA nach IL-4-Knockout? Warum kommt es trotz des Wegfalls der postulierten Hemmung der IL-17-Bildung durch IL-4 nicht zu einer Zunahme der Entzündungsreaktion?
2. Kann der AIA-Verlauf der IFN- $\gamma$ -Knockout-Maus, wie bei der CIA, durch zusätzliche Depletion von IL-4 aggraviert bzw. modifiziert werden.
3. Wie ist der Verlauf der AIA nach IL-4-Knockout in einem weniger TH1-polarisierten Modell, z.B. bei modifizierter Immunisierung ohne *Mycobacterium tuberculosis*? Zeigt sich, wie im Modell der CIA in der chronischen Phase ein gehäuftes Wiederaufflammen? Lassen sich Veränderungen auf Zytokinebene nachweisen?
4. Kann die unterstellte geschwächte Aktivierung der TH1-Antwort durch IL-4 auf Zytokinebene durch Bestimmung von IL-12 nachgewiesen werden ?
5. Gibt es nach IL-4-Knockout eine kompensatorische Steigerung von IL-13? Kann die unterstellte Wirkung von IL-13 in einem IL-4-Rezeptor-Knockout-System beeinflusst werden?

## **Literaturverzeichnis**

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383 (6603):787-793.
- ACR. 1996. Guidelines for monitoring drug therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39 (5):723-731.
- ACR. 2002. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum*, 46 (2):328-346.
- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 148 (1):32-46.
- Ahmed SA. 1994. Autoimmune lesions: Is the C57BL/6 mouse strain normal or autoimmunity-prone? [letter]. *Immunol Today*, 15 (8):389-390.
- Akahira-Azuma M, Szczepanik M, Tsuji RF, Campos RA, Itakura A, Mobini N, McNiff J, Kawikova I, Lu B, Gerard C, Pober JS, Askenase PW. 2004. Early delayed-type hypersensitivity eosinophil infiltrates depend on T helper 2 cytokines and interferon-gamma via CXCR3 chemokines. *Immunology*, 111 (3):306-317.
- Alber G, Kamradt, T. 2007. Regulation of protective and pathogenic Th17 responses. *Current Immunology Reviews*, 3 (1):3-16.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31 (3):315-324.
- Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. 1994. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol*, 24 (5):1097-1101.
- Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Sennello G, Chlipala E, Guy M. 1999. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol*, 27 (1):134-142.
- Bernhard J. 2001. Rheumatoide Arthritis- Pathogenese und Pathologie. *Schweiz Med Forum*, 8:179-183.
- Billich A. 2007. Drug evaluation: apilimod, an oral IL-12/IL-23 inhibitor for the treatment of autoimmune diseases and common variable immunodeficiency. *IDrugs*, 10 (1):53-59.
- Bluestone JA, Tang Q. 2005. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol*, 17 (6):638-642.
- Bolon B, Shalhoub V, Kostenuik PJ, Campagnuolo G, Morony S, Boyle WJ, Zack D, Feige U. 2002. Osteoprotegerin, an endogenous antiosteoclast factor for protecting bone in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46(12):3121-3135.

- Bottomly K. 1988. A functional dichotomy in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Immunol Today*, 9 (9):268-274.
- Boulay JL, Paul WE. 1992 Jun;. The interleukin-4 family of lymphokines. *Curr Opin Immunol*, 4(3): :294-298.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. 1977. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, 20 (3):841-850.
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR. 1977. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol*, 118 (5):1645-1648.
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR, Miller JF. 1977. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol*, 118 (5):1639-1644.
- Brand DD, Marion TN, Myers LK, Rosloniec EF, Watson WC, Stuart JM, Kang AH. 1996. Autoantibodies to murine type II collagen in collagen-induced arthritis: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains. *J Immunol*, 157 (11):5178-5184.
- Brauer R, Kette H, Henzgen S, Thoss K. 1994. Influence of cyclosporin A on cytokine levels in synovial fluid and serum of rats with antigen-induced arthritis. *Agents Actions*, 41 (1-2):96-98
- Breban MA, Moreau MC, Fournier C, Ducluzeau R, Kahn MF. 1993. Influence of the bacterial flora on collagen-induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. *Clin Exp Rheumatol*, 11 (1):61-64.
- Brodsky V, Czirjak L, Geher P, Hodinka L, Karpati K, Pentek M, Poor G, Szekanecz Z, Gulacsi L. 2007. [Rituximab in patients with rheumatoid arthritis: systematic review.]. *Orv Hetil*, 148 (40):1883-1893.
- Bruder D, Probst-Keppler M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 34 (3):623-630.
- Buchner E, Brauer R, Schmidt C, Emmrich F, Kinne RW. 1995. Induction of flare-up reactions in rat antigen-induced arthritis. *J Autoimmun*, 8 (1):61-74.
- Bucy RP, Panoskaltsis-Mortari A, Huang GQ, Li J, Karr L, Ross M, Russell JH, Murphy KM, Weaver CT. 1994. Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations. *J Exp Med*, 180 (4):1251-1262.
- Bullens DM, Kasran A, Thielemans K, Bakkus M, Ceuppens JL. 2001. CD40L-induced IL-12 production is further enhanced by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *Scand J Immunol*, 53 (5):455-463.
- Butler DM, Malfait AM, Maini RN, Brennan FM, Feldmann M. 1999. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*, 29 (7):2205-2212.

- Cao Y, Brombacher F, Tunyogi-Csapo M, Glant TT, Finnegan A. 2007. Interleukin-4 regulates proteoglycan-induced arthritis by specifically suppressing the innate immune response. *Arthritis Rheum*, 56 (3):861-870.
- Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ. 2006. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 116 (5):1317-1326.
- Cher DJ, Mosmann TR. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol*, 138 (11):3688-3694.
- Chowdhury TT, Bader DL, Lee DA. 2006. Anti-inflammatory effects of IL-4 and dynamic compression in IL-1beta stimulated chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 339 (1):241-247.
- Choy EH, Isenberg DA, Garrood T FS, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Hazleman B, Price R. 2002. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum*, 46, :3143-3150.
- Chu CQ, Swart D, Alcorn D, Tocker J, Elkon KB. 2007. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum*, 56 (4):1145-1151.
- Cocks BG, de Waal Malefyt R, Galizzi JP, de Vries JE, Aversa G. 1993. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *Int Immunol*, 5 (6):657-663.
- Coffman RL. 2006. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol*, 7 (6):539-541.
- Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, 283 (5748):666-668.
- Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. 1977. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med*, 146 (6):1585-1602.
- Cronstein BN. 2004. Therapeutic cocktails for rheumatoid arthritis: the mixmaster's guide. *Arthritis Rheum*, 50 (7):2041-2043.
- Crossley MJ, Spowage M, Hunneyball IM. 1987. Studies on the effects of pharmacological agents on antigen-induced arthritis in BALB/c mice. *Drugs Exp Clin Res*, 13 (5):273-277.
- D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med*, 181 (2):537-546.

- Dieli F, Asherson GL, Romano GC, Sireci G, Gervasi F, Salerno A. 1994. IL-4 is essential for the systemic transfer of delayed hypersensitivity by T cell lines. Role of gamma/delta cells. *J Immunol*, 152 (6):2698-2704.
- Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. 1996. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39 (12):1961-1969.
- Dumonde DC, Glynn LF. 1962. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Brit J Exp Pathol*, 43:373-383.
- El Mabrouk M, Qureshi HY, Li WQ, Sylvester J, Zafarullah M. 2007. Interleukin-4 antagonizes oncostatin M and transforming growth factor beta-induced responses in articular chondrocytes. *J Cell Biochem*, Jun1.
- Elfaki MG, O'Sullivan NL, Skandera CA, Montgomery PC. 1994. Inhibition of lymphocyte adherence to rat lacrimal acinar epithelium by interleukin-4 and transforming growth factor-beta 1. *Cell Immunol*, 153 (1):154-162.
- El-Gabalawy HD, Lipsky PE. 2002. Why do we not have a cure for rheumatoid arthritis? *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S297-301.
- Esser RE, Stimpson SA CW, Schwab JH. 1985. Reactivation of streptococcal cell wall-induced arthritis by homologous and heterologous cell wall polymers. *Arthritis Rheum*, 28(12):1402-1411.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell*, 85 (3):307-310.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*, 156 (1):5-7.
- Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES. 1988. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*, 168(2):543-558.
- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*, 8:303-333.
- Finnegan A, Mikecz K, Tao P, Glant TT. 1999. Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J Immunol*, 163(10):5383-5390.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170 (6):2081-2095.
- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423 (6937):356-361.

- Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R, Alvaro-Garcia JM. 1990. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 144 (9):3347-3353.
- Firestein GS, Zvaifler NJ. 1990. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum*, 33 (6):768-773.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 183 (6):2593-2603.
- Frasca D, Riley RL, Blomberg BB. 2007. Aging murine B cells have decreased class switch induced by anti-CD40 or BAFF. *Exp Gerontol*, 42 (3):192-203.
- Frasca D, Riley RL, Blomberg BB. 2007. Aging murine B cells have decreased class switch induced by anti-CD40 or BAFF. *Exp Gerontol*, 42 (3):192-203.
- Frei K, Eugster HP, Bopst M, Constantinescu CS, Lavi E, Fontana A. 1997. Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 185 (12):2177-2182.
- Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Brauer R. 2005. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther*, 7 (2):R291-301.
- Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. 2007. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*, 6 (3):169-175.
- Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL. 2003. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum*, 48 (1):54-58.
- Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE, Gay S. 1994. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum*, 37 (11):1664-1671.
- Germann T, Bongartz M, Dlugonska H, Hess H, Schmitt E, Kolbe L, Kolsch E, Podlaski FJ, Gately MK, Rude E. 1995. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol*, 25 (3):823-829.
- Griffiths RJ. 1992. Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions*, 35 (1-2):88-95.
- Gutcher I, Becher B. 2007. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*, 117 (5):1119-1127.
- Harigai M. 2007. [Effect of CTLA4-Ig on radiographic outcome of patients with rheumatoid arthritis]. *Clin Calcium*, 17 (4):577-584.

- Henzgen S, Petrow PK, Thoss K, Brauer R. 1996. Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice. A scanning and transmission electron microscopic study. *Exp Toxicol Pathol*, 48 (4):255-263.
- Highton J, Guevremont D, Thomson J, Carlisle B, Tucker I. 1999. A trial of clodronate-liposomes as anti-macrophage treatment in a sheep model of arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 17 (1):43-48.
- Holmdahl R, Goldschmidt TJ, Kleinau S, Kvick C, Jonsson R. 1992. Arthritis induced in rats with adjuvant oil is a genetically restricted, alpha beta T-cell dependent autoimmune disease. *Immunology*, 76 (2):197-202.
- Holmdahl R. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis. Why is rheumatoid arthritis associated with the MHC genetic region? An introduction. *Arthritis Res*, 2 (3):203-204.
- Hong KH, Cho ML, Min SY, Shin YJ, Yoo SA, Choi JJ, Kim WU, Song SW, Cho CS. 2007. Effect of interleukin-4 on vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 147 (3):573-579.
- Horsfall AC, Butler DM, Marinova L, Warden PJ, Williams RO, Maini RN, Feldmann M. 1997. Suppression of collagen-induced arthritis by continuous administration of IL-4. *J Immunol*, 159 (11):5687-5696.
- Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, WE. P. 1982. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med*, 155(3): :914-923.
- Hsieh CS HA, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13):6065-6069.
- Hsieh CS, Macatonia SE TC, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260(5107):547-549.
- Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21 (4):503-513.
- Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lavoie JP. 2007. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292 (5):L1147-1154.
- Hunneyball IM, Crossley MJ, Spowage M. 1986. Pharmacological studies of antigen-induced arthritis in BALB/c mice. I. Characterization of the arthritis and the effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents. *Agents Actions*, 18 (3-4):384-393.
- Hunneyball IM, Crossley MJ, Spowage M. 1986. Pharmacological studies of antigen-induced arthritis in BALB/c mice. II. The effects of second-line antirheumatic drugs and cytotoxic agents on the histopathological changes. *Agents Actions*, 18 (3-4):394-400.



- Irmeler IM, Gajda M, Brauer R. 2007. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN- $\gamma$ -deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol*, 179 (9):6228-6236.
- Isomaki P, Luukkainen R, Toivanen P, Punnonen J. 1996. The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39(10):1693-1702.
- Jacob CO, Holoshitz J, Van der Meide P, Strober S, McDevitt HO. 1989. Heterogeneous effects of IFN- $\gamma$  in adjuvant arthritis. *J Immunol*, 142 (5):1500-1505.
- Jacobs MJ, van den Hoek AE, van Lent PL, van de Loo FA, van de Putte LB, van den Berg WB. 1994. Role of IL-2 and IL-4 in exacerbations of murine antigen-induced arthritis. *Immunology*, 83 (3):390-396.
- Janeway CA. 2002. Immunologie. 5. Auflage. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- John S, Worthington J. 2001. Genetic epidemiology. Approaches to the genetic analysis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 3 (4):216-220.
- Joosten LA, Lubberts E, Durez P, Helsen MM, Jacobs MJ, Goldman M, van den Berg WB. 1997. Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum*, 40 (2):249-260.
- Kalinski P, Smits HH, Schuitemaker JH, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML. 2000. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol*, 165 (4):1877-1881.
- Kaminski DA, Stavnezer J. 2007. Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol*, 19 (4):545-556.
- Kanagawa O, Vaupel BA, Gayama S, Koehler G, Kopf M. 1993. Resistance of mice deficient in IL-4 to retrovirus-induced immunodeficiency syndrome (MAIDS). *Science*, 262 (5131):240-242.
- Kaplan C, Valdez JC, Chandrasekaran R, Eibel H, Mikecz K, Glant TT, Finnegan A. 2002. Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res*, 4 (1):54-58.
- Kikutani H IS, Sato R, Barsumian EL, Owaki H, Yamasaki K, Kaisho T, Uchibayashi N, Hardy RR, Hirano T. 1986. Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell*, 47(5):657-665.
- Kimberly RP, Salmon JE, Edberg JC. 1995. Receptors for immunoglobulin G. Molecular diversity and implications for disease. *Arthritis Rheum*, 38(3):306-314.
- Koenders MI, Joosten LA, van den Berg WB. 2006. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65 Suppl 3:iii29-33.

- Koller BH, Smithies O. 1992. Altering genes in animals by gene targeting. *Annu Rev Immunol*, 10:705-730.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 177 (1):566-573.
- Kong YY FU, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. 1999 Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402(6759):304-309.
- Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 362 (6417):245-248.
- Kopf M, Le Gros G, Coyle AJ, Kosco-Vilbois M, Brombacher F. 1995. Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol Rev*, 148:45-69.
- Korganow AS, Ji H MS, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D. 1999. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, 10(4):451-461.
- Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, 254 (5032):707-710.
- Lai YH, Mosmann TR. 1999. Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. *J Immunol*, 162 (1):78-87.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201 (2):233-240.
- Lee F, Yokota T, Otsuka T, Meyerson P, Villaret D, Coffman R, Mosmann T, Rennick D, Roehm N, Smith C. 1986. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell- and mast-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(7):2061-2065.
- Lehmann I. 2002. Interaktionen zwischen T-Zellen und Makrophagen bei der experimentellen Arthritis. Diplomarbeit, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der FSU Jena.
- Leipe J, Skapenko A, Lipsky PE, Schulze-Koops H. 2005. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7 (3):93.
- Lens JW, van den Berg WB, van de Putte LB. 1984a. Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with intravenous antigen: studies on the characteristics of and mechanisms involved in the reaction. *Clin Exp Immunol*, 55 (2):287-294.

- Lens JW, van den Berg WB, van de Putte LB, Berden JH, Lems SP. 1984b. Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with intravenous antigen: effects of pre-treatment with cobra venom factor and anti-lymphocyte serum. *Clin Exp Immunol*, 57 (3):520-528.
- Lens JW, van den Berg WB, van de Putte LB, van den Bersselaar L. 1984c. Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with oral antigen. *Clin Exp Immunol*, 58 (2):364-371.
- Lens JW, van den Berg WB, van de Putte LB, Zwarts WA. 1986. Flare of antigen-induced arthritis in mice after intravenous challenge. Kinetics of antigen in the circulation and localization of antigen in the arthritic and noninflamed joint. *Arthritis Rheum*, 29 (5):665-674.
- Lipsky P. 1995. Rheumatoide Arthritis. In: Schmailzl KJG, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin* 2, 13. Auflage. Aufl. Blackwell Wissenschafts Verlag, 1921-1930.
- Loewi G. 1968. Experimental immune inflammation in the synovial membrane. *Immunology*, 15:417-427.
- Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther*, 9 (1):202.
- Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum BE, Tedder TF, Gimbrone MA, Jr. 1994. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J Cell Biol*, 125 (6):1417-1427.
- Mak TW, Penninger JM, Ohashi PS. 2001. Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. *Nat Rev Immunol*, 1(1):11-19.
- Masinovsky B, Urdal D, Gallatin WM. 1990. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol*, 145 (9):2886-2895.
- Matsumoto I., Staub A, Benoist C, Mathis D. 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*, 286(5445):1732-1735.
- Mencacci A, Del Sero G, Cenci E, d'Ostiani CF, Bacci A, Montagnoli C, Kopf M, Romani L. 1998. Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4+ T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. *J Exp Med*, 187 (3):307-317.
- Michaud K, Messer J, Choi HK, Wolfe F. 2003. Direct medical costs and their predictors in patients with rheumatoid arthritis: a three-year study of 7,527 patients. *Arthritis Rheum*, 48 (10):2750-2762.
- Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, Nishida K, Caldwell H, Nuki G, Salter DM. 1999. Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol*, 145 (1):183-189.

- Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B. 1993. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362 (6417):248-250.
- Miossec P, van den Berg W. 1997. Review: Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum*, 40 (12):2105-2115.
- Montaner LJ, da Silva RP, Sun J, Sutterwala S, Hollinshead M, Vaux D, Gordon S. 1999. Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. *J Immunol*, 162(8):4606-4613.
- Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE. 2003. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 48 (5):1452-1460.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136 (7):2348-2357.
- Mosmann TR, Coffman RL. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*, 46:111-147.
- Mosmann TR, Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17 (3):138-146.
- Mukai M. 2007. [Management for TNF failure]. *Nippon Rinsho*, 65 (7):1299-1307.
- Mussener A, Litton MJ, Lindroos E, Klareskog L. 1997. Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*, 107 (3):485-493.
- Nandakumar KS, Holmdahl R. 2006. Arthritis induced with cartilage-specific antibodies is IL-4-dependent. *Eur J Immunol*, 36 (6):1608-1618.
- Nemoto O, Yamada H, Kikuchi T, Shinmei M, Obata K, Sato H, Seiki M. 1997. Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. *J Rheumatol*, 24 (9):1774-1779.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. 2004. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 50 (6):1761-1769.
- Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES. 1984. Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(19): :6149-6153.
- O'Dell JR. 2004. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 350 (25):2591-2602.
- Paul. 1991. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*, 77(9):1859-1870.

- Pearson CM. 1956. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvans. *Proc Soc Exp Biol Med*, 91:95-101.
- Petrow PK, Thoss K, Katenkamp D, Bräuer R. 1996. Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Invest*, 25 (4):341-353.
- Petrow PK, Bräuer R. 1997. T-Zellen und rheumatoide Arthritis. In: Vogt S, Hrsg. *Arthritiden Update: Clinical Immunology*. Aufl. Leipzig: Pabst Science Publishers, 300-315.
- Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Muller R, Goldring SR, Choi Y, Benoist C, Gravalles EM. 2001. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol*, 159(5):1689-1699.
- Piccirillo CA, Thornton AM. 2004. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol*, 25 (7):374-380.
- Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Sattonnet-Roche P, Siegfried C, Alouani S, van De Loo FA, Graber P, Aloni S, Cirillo R, Lubberts E, Dinarello CA, van den Berg WB, Chvatchko Y. 2001. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. *J Clin Invest*, 108 (12):1825-1832.
- Pohlert D, Schmidt-Weber CB, Franch A, Kuhlmann J, Brauer R, Emmrich F, Kinne RW. 2002. Differential clinical efficacy of anti-CD4 monoclonal antibodies in rat adjuvant arthritis is paralleled by differential influence on NF-kappaB binding activity and TNF-alpha secretion of T cells. *Arthritis Res*, 4 (3):184-189.
- Pohlert D, Nissler K, Frey O, Simon J, Petrow PK, Kinne RW, Brauer R. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol*, 135 (3):409-415.
- Purkerson JM, Isakson PC. 1991. Isotype switching in anti-immunoglobulin-activated B lymphoblasts: differential requirements for interleukin 4 and other lymphokines to elicit membrane vs. secreted IgG1. *Eur J Immunol*, 21 (3):707-714.
- Redlich K HS, Maier A, Dunstan CR, Tohidast-Akrad M, Lang S, Turk B, Pietschmann P, Woloszczuk W, Haralambous S, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Schett G. 2002. Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum*, 46(3):785-792.
- Riede UN, Werner M, Schäfer HE 2004. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Aufl.5 Thieme Verlag. 1169-1171
- Romeis B. 1989. *Mikroskopische Technik*. Aufl. München-Wien-Schwarzenberg: Urban und Schwarzenberg.
- Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH. 1998. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol*, 10 (5):651-662.

- Sack U, Kuhn H, Ermann J, Kinne RW, Vogt S, Jungmichel D, Emmrich F. 1994. Synovial tissue implants from patients with rheumatoid arthritis cause cartilage destruction in knee joints of SCID.bg mice. *J Rheumatol*, 21(1):10-16.
- Sack U, Kuhn H, Kampfer I, Genest M, Arnold S, Pfeiffer G, Emmrich F. 1996. Orthotopic implantation of inflamed synovial tissue from RA patients induces a characteristic arthritis in immunodeficient (SCID) mice. *J Autoimmun*, 9(1):51-58.
- Sarkar S, Tesmer LA, Hindnavis V, Endres JL, Fox DA. 2007. Interleukin-17 as a molecular target in immune-mediated arthritis: immunoregulatory properties of genetically modified murine dendritic cells that secrete interleukin-4. *Arthritis Rheum*, 56 (1):89-100.
- Schmitt E, Beuscher HU, Huels C, Monteyne P, van Brandwijk R, van Snick J, Ruede E. 1991. IL-1 serves as a secondary signal for IL-9 expression. *J Immunol*, 147 (11):3848-3854.
- Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T. 2004. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol*, 172 (7):4503-4509.
- Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, Van Offel JF, Bridts CH, De Clerck LS. 2003. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage*, 11 (9):681-687.
- Seder RA, Paul WE. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*, 12:635-673.
- Skapenko A, Wendler J, Lipsky PE, Kalden JR, Schulze-Koops H. 1999. Altered memory T cell differentiation in patients with early rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 163 (1):491-499.
- Smolen JS, Steiner G. 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*, 2 (6):473-488.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*, Vol. 370, Issue 9602, 1 December 2007, 1861-1874
- Snapper CM, Paul WE. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 236(4804):944-947.
- Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE. 1988. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med*, 167(1):183-196.
- Snapper CM, Mond JJ. 1993. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today*, 14 (1):15-17.
- Stamp LK, James MJ, Cleland LG. 2004. Interleukin-17: the missing link between T-cell accumulation and effector cell actions in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol*, 82 (1):1-9.
- Stasiuk LM, Abehsira-Amar O, Fournier C. 1996. Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: cytokine gene activation following immunization with type II collagen. *Cell Immunol*, 173 (2):269-275.

- Steinman L. 2005. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov*, 4 (6):510-518.
- Steinman L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 13 (2):139-145.
- Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW, Wilder RL. 1989a. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7):2374–2378.
- Sternberg EM, Young WS, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold P. W., Wilder RL. 1989b. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(12): 4771–4775.
- Svensson L, Nandakumar KS, Johansson A, Jansson L, Holmdahl R. 2002. IL-4-deficient mice develop less acute but more chronic relapsing collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*, 32 (10):2944-2953.
- Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. 2001. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol*, 31(4):1122-1131.
- Tanaka S. 2007. [RANKL as a target molecule for treatment of joint destruction]. *Clin Calcium*, 17 (4):586-592.
- Turner IH, Nakajima A, Seroogy CM, Ermann J, Levicnik A, Contag CH, Fathman CG. 2002. Retroviral gene therapy of collagen-induced arthritis by local delivery of IL-4. *Clin Immunol*, 105 (3):304-314.
- Togashi Y, Chamoto K, Wakita D, Tsutsumi N, Iwakura Y, Matsubara N, Kitamura H, Nishimura T. 2007. Natural killer T cells from interleukin-4-deficient mice are defective in early interferon-gamma production in response to alpha-galactosylceramide. *Cancer Sci*, 98 (5):721-725.
- Toh ML, Miossec P. 2007. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol*, 19 (3):284-288.
- Trenn G TH, Hu-Li J, Paul WE, Sitkovsky MV. 1988. B cell stimulatory factor 1 (IL-4) enhances the development of cytotoxic T cells from Lyt-2+ resting murine T lymphocytes. *J Immunol*, 140(4):1101-1106.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH. 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 146 (3):857-868.
- van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ. 2002. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res*, 4 (2):87-93.

- van den Berg WB, Kruijsen MW, van de Putte LB, van Beusekom HJ, van der Sluis-van der Pol M, Zwarts WA. 1981. Antigen-induced and zymosan-induced arthritis in mice: studies on in vivo cartilage proteoglycan synthesis and chondrocyte death. *Br J Exp Pathol*, 62 (3):308-316.
- van den Berg WB, Lens JW, van de Putte LB, van Beusekom HJ. 1982. Antigen induced arthritis: antigen handling and chronicity of joint inflammation. *Agents Actions Suppl*, 11:233-241.
- van den Berg WB, van de Putte LBA, Zwarts WA, Joosten, L.A.B 1984. Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice. *J Clin Invest*, 74:1850-1859.
- van den Bosch. 1998. rHu IL-4 in subjects with active rheumatoid arthritis (RA): a phase I dose escalating safety study. *Arthritis Rheum*, 41 Suppl 9:56.
- van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TW, Schreuder GM, Breedveld FC, Zanelli E, van Venrooij WJ, Verweij CL, Toes RE, de Vries RR. 2004. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 50 (7):2113-2121.
- van Kooten C, Banchereau J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67 (1):2-17.
- van Roon JA, Lafeber FP, Bijlsma JW. 2001. Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 44 (1):3-12.
- van Roon JA, van Roy JL, Duits A, Lafeber FP, Bijlsma JW. 1995. Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T helper-1 activation is inhibited by interleukin-4. *Ann Rheum Dis*, 54 (10):836-840.
- van Roon JA, van Roy JL, Gmelig Meyling FH, Lafeber FP, Bijlsma JW. 1996. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum*, 39 (5):829-835.
- Verhoef CM, van Roon JA, Vianen ME, Bijlsma JW, Lafeber FP. 2001. Interleukin 10 (IL-10), not IL-4 or interferon-gamma production, correlates with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 28 (9):1960-1966.
- Wei XQ, Leung BP, Arthur HM, McInnes IB, Liew FY. 2001. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. *J Immunol*, 166 (1):517-521.
- Weiner HL. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 182:207-214.
- Weyand CM. 2000. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 39 Suppl 1:3-8.
- Weyand CM, Goronzy JJ. 2000. Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2 (3):212-216.



Yang XD, Karin N, Tisch R, Steinman L, McDevitt HO. 1993. Inhibition of insulinitis and prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by blocking L-selectin and very late antigen 4 adhesion receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (22):10494-10498.

Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356 (6364):63-66.

Yoo TJ, Kim SY, Stuart JM, Floyd RA, Olson GA, Cremer MA, Kang AH. 1988. Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J Exp Med*, 168:777-782.

Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. 1998. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol*, 161 (7):3400-3407.

Yoshino S, Yoshino J. 1998. Effect of a monoclonal antibody against interleukin-4 on suppression of antigen-induced arthritis in mice by oral administration of the inducing antigen. *Cell Immunol*, 187 (2):139-144.

Zendman AJ, Vossenaar ER, van Venrooij WJ. 2004. Autoantibodies to citrullinated (poly)peptides: a key diagnostic and prognostic marker for rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 37(4):295-299.

Zurawski G, de Vries JE. 1994. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today*, 15 (1):19-26.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer für die Überlassung des Themas, für seine wissenschaftliche Betreuung und sein offenes Ohr bei Fragen.

Allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Unterstützung, für die kritische Diskussion der Daten sowie für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei R. Stöckigt, C. Hüttich, W. Kröber, H. Börner, und U. Griechen für ihre exzellente technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente.

Für die Beurteilung der Histologien bedanke ich mich bei Dr. med. Peter Petrow (ehem. Pathologisches Institut FSU Jena).

Bei meinen lieben Eltern Dr. med. Werner Michel und Bärbel Michel für die Ermöglichung des Studiums und die geduldige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meiner Freundin Sünje Bothmann danke ich für die Motivation und Toleranz, die sie für mich und meine Arbeit aufgebracht hat.

Bei Frau Dr. Christine Bothmann und Doris Ebert für die Korrekturlesungen.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:

Prof. Dr. Rolf Bräuer

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Heide, 30.04.2008

Thorsten Michel, Verfasser